

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Thorsten Pisch

aus Kirchheim unter Teck

Tag der mündlichen Prüfung:

**Präklinische Evaluation einer
Vakzinierungsstrategie gegen HIV-1
basierend auf konformationellen
Epitopen des Env-Glykoproteins**

Gutachter:

Prof. Dr. Valerie Bosch

Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich

**In Liebe und Dankbarkeit
Meinen Eltern**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2001 bis September 2005 am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Valerie Bosch angefertigt.

DANKSAGUNG

Ganz besonders möchte ich Frau Prof. Dr. Valerie Bosch für die ausgezeichnete persönliche Betreuung, die vielen wertvollen Anregungen und den engagierten Einsatz für meine Arbeit danken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Kräusslich für seine Bereitschaft, das Koreferat zu übernehmen.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Labors 2.119, insbesondere Dr. Denise Holtkotte, sei für ihre tatkräftige Unterstützung und eine schöne Arbeitsatmosphäre gedankt. Es hat Spaß gemacht, mit Euch zu arbeiten!

Ebenso danken möchte ich weiteren Mitarbeitern des Forschungsschwerpunkts *Infektion und Krebs*, insbesondere Lysann Schädlich, PD Dr. Martin Müller, Thomas Holz und Dr. Ignacio Gonzalez Bravo, sowie Dr. Oliver Keppler und Dr. Sandra Sparacio des Hygiene-Instituts der Universität Heidelberg für Ihre fachliche und moralische Unterstützung.

Astrid Albrecht danke ich herzlich für ihre jahrelange Hilfe und Unterstützung im beruflichen und privaten Bereich.

Ich danke dem Segen Gottes für mein Leben und meine Arbeit.

Ich widme diese Dissertation meinen Eltern Hertha und Wilhelm Pisch dafür, dass sie mir diese Arbeit ermöglicht haben und für alles, was ich ihnen verdanke.

ZUSAMMENFASSUNG

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer durch ein potentes HIV-Vakzin induzierten Immunantwort, welches auf konformationellen Env-Epitopen basiert, die durch die Interaktion mit dem zellulären Rezeptorkomplex (CD4/CXCR-4) induziert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass Pseudovirionen (PV) mit eingebauten HIV-Env- bzw. CD4/CXCR-4-Molekülen eine Env-vermittelte Fusion miteinander eingehen können. In dieser Arbeit wurde ein Env- und CD4/CXCR-4-PV-Gemisch in einer Zwischenphase der Fusion fixiert, während derer induzierte Env-Epitope exponiert werden, und die induzierte Immunantwort nach Immunisierungen von Versuchstieren mit diesem PV-Vakzin analysiert.

Am Anfang dieser Arbeit wurden Versuche zur Charakterisierung und Verbesserung der Zusammensetzung und Eigenschaften der für das PV-Vakzin verwendeten Pseudovirionen durchgeführt. Wesentliche Verbesserungen wurden hinsichtlich der Effizienz der PV-Herstellung und bezüglich der PV-Reinheit erzielt.

Zahlreiche Immunisierungsexperimente in nicht transgenen Mäusen zeigten, dass die Immunisierung mit Pseudovirionen allein keine starke Immunantwort induziert, und dass eine *prime*-Immunisierung mit rekombinanten Env-Proteinen notwendig ist, um das Immunsystem effizient auf die geringen Mengen konformationell relevanter Env-Moleküle im PV-Vakzin zu lenken. Neben der Induktion von Env-Antikörpern in den Seren erlaubte das veränderte Protokoll auch die Generierung Env-spezifischer monoklonaler Antikörper (Mabs). Da das PV-Vakzin auch CD4 und CXCR-4 enthielt, wurden weitere Immunisierungen in dagegen toleranten huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten durchgeführt. In einem initialen Immunisierungsexperiment wurden durch das PV-Vakzin neutralisierende Antikörper im Serum induziert und außerdem ein Env-spezifischer monoklonaler Antikörper (R I.23 B/3) generiert, der ein heterologes HIV-1 Primärisolat (J27) neutralisieren kann. Unseres Wissens ist dies der erste nach Vakzinierungen in Versuchstieren hergestellte Mab, der ein heterologes HIV-1 Primärisolat neutralisieren kann. Obwohl die Serumantikörper der vakzinieren Ratten kein Vermögen zur Kreuzneutralisation zeigten, war der Titer gegen homologes Virus höher als in den Seren der Ratten, die mit großen Mengen an rekombinanten Env-Proteinen *geboostet* wurden. Außerdem zeigte das Tier, welches dieselbe Menge an Env-PV wie im PV-Vakzin erhalten hatte (allerdings ohne ein Mischen mit CD4/CXCR-4-PV), keine neutralisierende Immunantwort. Dies bedeutet möglicherweise, dass konformationelle Epitope des PV-Vakzins für die Induktion der neutralisierenden Immunantwort verantwortlich sind und die geringen Mengen der darin enthaltenen Env-Proteine kompensieren.

Diese Immunantworten wecken die Hoffnung, dass Optimierungen des PV-Vakzins, insbesondere die Erhöhung des Env-Einbaus in PV, zur Induktion einer qualitativ besseren Immunantwort führen und somit die Grundlage für weitere Forschungsansätze zur Anwendung im Menschen darstellen könnten.

SUMMARY

The major aim of this thesis was to analyze the responses elicited by a potential HIV vaccine based on conformational Env epitopes, induced on interaction with the cellular receptor complex (CD4/CXCR-4). Previous experiments in our laboratory have shown that pseudovirions (PVs), with incorporated HIV-Env or CD4/CXCR-4, respectively, can undergo Env-mediated fusion with one another. Thus in the present strategy, mixtures of these Env- and CD4/CXCR-4-PVs were fixed at an intermediate fusion stage, when induced Env conformations are exposed, and the immune responses induced after immunization of experimental animals were analysed.

In the early stages of this thesis, experiments to establish and to improve the composition and properties of the respective pseudovirions, which constitute the potential vaccine, were performed. Major improvements with respect to time and ease of PV-production and PV-purity were achieved.

Several series of immunizations in non-transgenic mice revealed that inoculation with PVs alone was not sufficient to induce a robust immune response and that a prime with recombinant Env-protein was necessary in order to focus the immune system on the small amount of conformationally relevant Env in the PV-vaccine. In addition to the induction of Env-specific serum antibodies, this modified protocol now allowed the generation of Env specific monoclonal antibodies (Mabs). Since CD4 and CXCR-4 are components of the PV-vaccine, further experiments in huCD4/huCXCR-4 transgenic rats, which are tolerant to these components, were carried out. In an initial experiment, neutralizing serum antibodies were induced by the vaccine and an Env-specific rat monoclonal antibody (R I.23 B/3), capable of neutralizing a heterologous primary HIV-1 strain (J27), was generated. To our knowledge, no further Mabs, elicited by a vaccine in an animal model, and capable of neutralizing a primary HIV, have been described. Although the serum antibodies in the vaccinated rat did not exhibit broadly neutralizing activity, nevertheless, the titer against homologous virus was higher than in control sera of rats boosted with high amounts of recombinant Env protein. Furthermore, the animal which had received the same amount of Env-PV as in the PV-vaccine (but not mixed with CD4/CXCR-4-PV) did not exhibit a neutralization response. This could indicate that induced epitopes in the PV-vaccine are instrumental in the induction of the neutralization response and compensate for the low amount of total Env protein in the PV-preparation.

These immune responses raise the hope that improvements in the PV-vaccine composition - in particular by increasing the extent of Env incorporation - may lead to the induction of a superior immune response and lay the basis for further developments for human use.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	HIV und AIDS	1
1.2	Retroviren	2
1.3	Die Morphologie von HIV-1	3
1.4	Genomstruktur, Transkripte und Proteine von HIV-1	3
1.5	Replikationszyklus von HIV-1	5
1.5.1	Frühe Schritte bis zur Integration des viralen Genoms	6
1.5.2	Frühe Genexpression	6
1.5.3	Expression der Strukturproteine und Viruszusammensetzung und -freisetzung	7
1.5.4	Die akzessorischen Proteine	8
1.6	Die HIV-1-Env-Glykoproteine	9
1.6.1	Struktur von HIV-1-Env	9
1.6.2	Biosynthese von HIV-1-Env	10
1.6.3	Einbau von HIV-1-Env in Virionen	11
1.6.4	HIV-1-Env während des Fusionsprozesses	11
1.7	Immunologie der HIV-1-Infektion	13
1.7.1	Verlauf einer HIV-1-Infektion in Patienten	13
1.7.2	Probleme bei der Kontrolle einer HIV-Infektion durch das Immunsystem	14
1.7.3	Die adaptive Immunantwort bei Virusinfektionen	15
1.7.3.1	Die zelluläre Immunantwort	15
1.7.3.2	Die humorale Immunantwort	16
1.7.4	Kreuzneutralisierende Antikörper	17
1.8	Tierexperimentelle Systeme	18
1.8.1	Mit HIV nicht infizierbare Tiere	18
1.8.2	Mit HIV bzw. SIV/SHIV infizierbare Tiere	18
1.8.2.1	Schimpansen	18
1.8.2.2	SIV/SHIV-Modell	19
1.8.2.3	Manipulierte Nagetiermodelle	19
1.9	HIV-1-Vakzinierungsstudien	20
1.9.1	Induktion einer größtenteils zellulären Immunantwort	20
1.9.1.1	Attenuiertes Virus	20
1.9.1.2	DNA-Vakzine	21
1.9.1.3	Vektor-Vakzine	21
1.9.2	Induktion einer größtenteils humoralen Immunantwort	22
1.9.2.1	Protein- bzw. <i>Subunit</i> -Vakzine	22
1.9.2.2	Inaktiviertes Virus	22
1.9.2.3	HIV-VLPs bzw HIV-PV	23
1.9.2.4	Exposition von induzierten Env-Epitopen	23
1.10	Zielsetzung	25
2	MATERIAL	26
2.1	Antikörper	26
2.1.1	Primärantikörper	26
2.1.2	Sekundärantikörper	28
2.2	Bakterien	28
2.3	Eukaryotische Zelllinien	28
2.3.1	Adhärente Zellen	28
2.3.2	Suspensionszellen	28
2.4	Versuchstiere	29
2.5	Enzyme	29
2.6	Proteine	29
2.7	Nukleinsäuren	30
2.7.1	Plasmide	30
2.7.2	Oligonukleotide	33
2.8	Viren	33

2.9	Kits	34
2.10	Größenstandards	34
2.11	Chemikalien und Reagenzien	34
2.12	Puffer und Lösungen	35
2.13	Bakterien- und Zellkulturmedien und -zusätze	40
2.13.1	Bakterienkultur	40
2.13.2	Zellkultur	41
2.14	Geräte	41
2.15	Verbrauchsmaterialien	42
3	METHODEN	44
3.1	Mikrobiologische Methoden	44
3.1.1	Lagerung und Kultur von Bakterien	44
3.1.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien	44
3.1.3	Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock	45
3.1.4	Kryokonservierung und Rekultivierung von Bakterien	45
3.2	Molekularbiologische Methoden	45
3.2.1	Plasmid-DNA-Minipräparation	45
3.2.2	Plasmid-DNA-Maxipräparation	46
3.2.3	Plasmid-DNA-Gigapräparation	47
3.2.4	Aufreinigung von Nukleinsäuren	47
3.2.4.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	47
3.2.4.2	Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	47
3.2.5	Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	48
3.2.6	Restriktionsverdau von DNA	48
3.2.7	Ligation	49
3.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.2.9	DNA-Elution aus Agarosegelen	50
3.2.10	Polymerasekettenreaktion	50
3.2.11	Oligonukleotidsynthese	52
3.3	Zellkultur	52
3.3.1	Lagerung und Kultur eukaryotischer Zellen	52
3.3.2	Bestimmung der Zellzahl	53
3.3.3	Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion in Zellkulturschalen	53
3.3.4	Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion in <i>Zell-Factories</i>	54
3.3.5	Aufreinigung von Pseudovirionen durch Ultrazentrifugation	55
3.3.6	Aufreinigung von Pseudovirionen durch Ultrafiltration	55
3.3.6.1	Ultrafiltrationsfereinheit	55
3.3.6.2	Ultrafiltrationssäulen	56
3.4	Infektionen und Transduktionen	56
3.4.1	Infektiosität von Pseudovirionen oder fusionierten PV-Strukturen	56
3.4.2	Kinetik der PV-Fusion	57
3.4.3	Virusneutralisations-Assay	57
3.5	Herstellung des PV-Vakzins	58
3.5.1	Herstellung des Wt-PV-Vakzins (Env ^{WT} -Vakzin, chemische Fixierung)	58
3.5.2	Herstellung des PV-Vakzins mit mutiertem HIV-1-Env (Env ^{Fus} -Vakzin, genetische Fixierung)	59
3.6	Proteinanalyse	59
3.6.1	Indirekte Immunfluoreszenz	59
3.6.2	Partikelimmunfluoreszenz	60
3.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
3.6.4	Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen	62
3.6.5	Western Blot und ECL (<i>enhanced chemoluminescence</i>)	63
3.6.6	Strippen von gefärbten Western-Blot-Membranen	64
3.6.7	Herstellen von Zell- und Viruslysaten (1% Triton X-100)	64
3.6.8	CA-ELISA (<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>)	65
3.6.9	gp120-, gp41-, CA- und BSA-Antikörper-ELISA	65

3.6.10	Nachweis zellulärer β -Galaktosidase-Expression (X-Gal-Assay)	66
3.6.11	Nachweis zellulärer Luziferaseexpression	67
3.7	Immunisierungen von Versuchstieren	67
3.7.1	Immunisierungen mit einem 7 Tage-Immunisierungsprotokoll	67
3.7.2	Immunisierungen mit einem Standard-Immunisierungsprotokoll über zwei Monate	67
3.7.3	Immunisierungen mit einer Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein	68
3.7.3.1	Mäuse	68
3.7.3.2	huCD4/huCXCR-4 transgene Ratten	69
3.8	Herstellung monoklonaler Antikörper spezifisch für das HIV-1-Env-Protein	70
3.8.1	Gewinnung von <i>Feeder</i> -Zellen	71
3.8.2	Gewinnung von B-Lymphozyten aus immunisierten Versuchstieren	71
3.8.3	Lymphknoten- und Milzfusion mit Myelomzellen	71
3.8.4	Subklonierung und anschließende Expandierung von Hybridomzellen	73
3.8.5	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Protein-G-Sepharose- <i>beads</i>	73
3.9	Gewinnung und Charakterisierung von Antikörpern aus Versuchstierblut	74
3.9.1	Gewinnung von Serum aus dem Blut immunisierter Versuchstiere	74
3.9.2	Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Protein-G-Sepharose-Säule	74
3.9.3	Ultrafiltrationsaufreinigung affinitätsaufgereinigter Antikörper	75
4	ERGEBNISSE	76
4.1	Expressionskonstrukte	77
4.1.1	Konstrukte zur PV-Produktion	77
4.1.2	Env-Expressionskonstrukte	78
4.1.3	CD4- und CXCR-4-Expressionskonstrukte	78
4.2	Membranfusion zwischen Env ^{WT} -PV und CD4/X4-PV	78
4.2.1	Pseudovirionen in Zellkulturüberständen	80
4.2.2	Einfluss von Aufreinigung und Lagerung der Pseudovirionen auf ihre Funktionalität	80
4.2.3	Fusionskinetik von Pseudovirionen in Zellkulturüberständen	82
4.3	PV-Produktion und -Proteinzusammensetzung	84
4.3.1	PV-Produktion in Zellkulturschalen	84
4.3.2	Verbesserungen der PV-Produktion	85
4.3.2.1	PV-Produktion in Medien mit reduziertem FCS-Gehalt	85
4.3.2.2	Zell- <i>Factories</i>	86
4.3.2.3	Ultrafiltration	87
4.3.3	Mit Coomassie-Blau färbbare Proteine in PV-Präparationen	89
4.3.4	Nachweis von eingebautem Env-Glykoprotein und eingebautem CD4-Protein in Pseudovirionen	90
4.4	Versuche zur Erhöhung des Env-Einbaus in Pseudovirionen	92
4.4.1	HIV-1-Env mit heterologem Signalpeptid	92
4.4.2	Kodonoptimiertes HIV-1-Env	93
4.5	Immunogenität von PV-Präparationen in immunisierten Versuchstieren	95
4.5.1	Env-Titer in den Seren immunisierter Versuchstiere	95
4.5.2	Versuche zur Herstellung HIV-1- Env-spezifischer muriner Hybridomzellen	97
4.6	Immunisierungen von Mäusen mit einer Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein	99
4.6.1	Analyse der Seren immunisierter Mäuse	100
4.6.2	Herstellung und Charakterisierung muriner monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1-Env-Protein	101
4.7	Immunisierungen in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten	108
4.7.1	Analyse der Seren	110
4.7.1.1	Analyse der gp120-, gp41, CA- und BSA-Bindungstiter in Seren	110
4.7.1.2	Analyse des Neutralisationsvermögens von Seren immunisierter Ratten	113
4.7.2	Etablierung der IgG-Aufreinigung	115

4.7.3	Analyse der aus Rattenserum affinitätsaufgereinigten Immunglobuline	117
4.7.4	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper spezifisch für das HIV-1-Env-Protein	120
5	DISKUSSION	124
5.1	Herstellung der PV-Präparationen	124
5.2	Einbau von Env-Glykoproteinen in Pseudovirionen	125
5.3	Versuche zur Erhöhung der Einbauwerte von Env-Glykoproteinen in Pseudovirionen	126
5.3.1	Austausch des HIV-1-Env-Signalpeptids	126
5.3.2	Kodonoptimiertes Env-Expressionskonstrukt	127
5.4	Eigenschaften des Vakzins	128
5.4.1	Eigenschaften der induzierten Env-Konformationen	128
5.4.2	Anzahl der Env-Moleküle mit induzierten Epitopen	129
5.4.3	Nachweis von induzierten Env-Epitopen	130
5.5	Vorstudien zur Env-spezifischen humoralen Immunantwort in Mäusen	130
5.6	Humorale Immunantwort in Mäusen nach Immunisierungen mit einem veränderten Protokoll	131
5.7	Humorale Immunantwort in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten	133
5.8	Einordnung der Ergebnisse	134
5.9	Ausblick	136
6	ANHANG	137
6.1	Partikelimmunfluoreszenz	137
6.2	pcDNA-X4-IRES-CD4 - Klonierungsstrategie und Charakteristika	139
6.3	Berechnung der Anzahl der Env-Trimere und CD4-Proteine in Pseudovirionen ...	141
6.4	Abkürzungen	141
7	LITERATURVERZEICHNIS	145

1 EINLEITUNG

1.1 HIV und AIDS

AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*, bezeichnet das Endstadium einer durch HIV (*human immunodeficiency virus*) verursachten Krankheit. Das Krankheitsbild von opportunistischen Infektionen und Tumorentstehungen unter gleichzeitiger Reduktion zirkulierender CD4⁺-T-Zellen wurde 1981 zum ersten Mal beschrieben (Gottlieb *et al.*, 1981; Masur *et al.*, 1981). Die Isolierung eines Retrovirus in den Jahren 1983 und 1984 aus dem Blut von AIDS-Patienten bestätigte die Vermutung, dass es sich um eine Viruserkrankung handelt (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983; Levy *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984). Diese isolierten Viren werden nach heutiger Nomenklatur dem Subtyp HIV-1 B zugeordnet. 1986 erfolgte die Isolierung eines verwandten Virus aus einem westafrikanischen AIDS-Patienten, welches HIV-2 genannt wurde (Clavel *et al.*, 1986).

Trotz der relativ späten Entdeckung des Virus in den 80er Jahren beweisen serologische Analysen von eingefrorenen Plasmaproben hinsichtlich des Vorhandenseins von HIV-Antikörpern und HI-Viren, dass das Virus bereits in den 70er Jahren in Afrika verbreitet war. Die früheste charakterisierte HIV-Infektion wurde einer eingefrorenen afrikanischen Serumprobe von 1959 zugeordnet (Zhu *et al.*, 1998).

Obwohl der Ursprung von HIV noch nicht ganz geklärt ist, geht man heute von einer frühen Virusevolution in Zentralafrika aus. Die wahrscheinlichste Quelle von HIV ist dabei das *simian immunodeficiency virus* (SIV). Nach Sequenzanalysen verschiedener Virusstämme fand man heraus, dass HIV-1 zu SIV^{cpz}-Stämmen (spezifisch für Schimpansen, siehe 1.8.2.1) (Gao *et al.*, 1999), und HIV-2 zu SIVsm-Stämmen (spezifisch für Mangaben, *sooty mangabeys*) (Gao *et al.*, 1992) in einem engen verwandtschaftlichen Verhältnis steht.

Seit Ausbruch der Pandemie starben laut WHO (Stand 2004) bereits über 18 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-1- oder HIV-2-Infektion. Weltweit gibt es heute ca. 42 Millionen HIV-infizierte Menschen, 80% davon leben in Zentralafrika und Südostasien. Darunter sind 2,1 Millionen Kinder unter 15 Jahren. Allein 2004 kam es weltweit zu 4,9 Millionen HIV-Neuinfektionen und zu 3,1 Millionen Todesfällen. Auch in den Industrienationen nimmt trotz umfassender Sexualaufklärung und eines modernen medizinischen und sozialen Umfelds die Zahl der HIV-infizierten Menschen weiter zu. Nach den Berechnungen des Robert-Koch-Instituts (Stand 2005) leben derzeit 44.000 HIV-Infizierte in Deutschland, darunter 9.500 Frauen und mehrere hundert Kinder. Die Zahl der Patienten mit dem Vollbild AIDS wird auf 5.000 geschätzt.

In den vergangenen zweieinhalb Jahrzehnten seit der Entdeckung der Krankheit wurden beachtliche Erkenntnisse im Bezug auf HIV-Struktur, -Replikation, -Diagnostik und -Therapie

gewonnen. Diese Kenntnisse und ihre Anwendung reichen bisher allerdings noch nicht aus, ein schützendes, prophylaktisches HIV-Vakzin oder einen therapeutischen, heilenden Wirkstoff gegen HIV herzustellen.

1.2 Retroviren

HIV-1 und HIV-2 gehören zur Gruppe der Retroviren. Diese RNA-Viren tragen ihren Namen aufgrund des Enzyms Reverse Transkriptase. Mit der Entdeckung dieses Enzyms wurde der bis dahin verbreiteten Annahme, dass DNA immer in RNA umgeschrieben wird, und nicht umgekehrt, ein Ende gesetzt. Retroviren als Ursache von Tumoren in Geflügel wurden schon 1908 von Ellerman und 1911 von Rous (Ellerman und Bang, 1908; Rous, 1911) beschrieben. Sie induzieren Tumore im Bindegewebe und wurden später als Onko-RNA-Viren bezeichnet. Neben der Charakterisierung weiterer tierpathogener Retroviren (MPMV, Mason-Pfizer-Affen-Virus; Mo.MLV, Moloney-Maus-Leukämie-Virus; MMTV, *mouse mammary tumor virus*) wurden Retroviren zum ersten Mal 1980 mit menschlichen Infektionen in Verbindung gebracht. Als erstes Tumovirus des Menschen überhaupt beschrieben Poiesz *et al.* das *human T-cell leukemia virus type one* (HTLV-1), welches T-Zell-Leukämien hervorruft (Poiesz *et al.*, 1980).

Retroviren werden in sieben Genera eingeteilt, nämlich in die "einfachen" Alpha-, Beta- und Gammaretroviren sowie die „komplexen“ Deltaretro-, Epsilonretro-, Lenti- und Spumaviren. Die einfachen Retroviren besitzen nur *gag*-, *pol*- und *env*-Gene, während das Genom der komplexen Retroviren eine Reihe zusätzlicher Gene zur Kodierung regulatorischer und akzessorischer Proteine enthält. Unter den Lentiviren ist HIV-1 der bekannteste Erreger. Ausgehend vom lateinischen Wort *lentus* = langsam bekam die Virusgruppe durch ihre charakteristische, lange Inkubationszeit und den anschließenden progressiven Krankheitsverlauf ihren Namen. HIV-1 wird weiter in die Gruppen M (*main*), N (*near*) und O (*outliner*) unterteilt, Gruppe M spaltet sich noch weiter in die Subtypen A-J. HIV-2 wird unterteilt in die Subtypen A-F. Ebenfalls der Gruppe der Lentiviren werden EIAV (*equine infectious anemia virus*), MVV (*maedi visna virus*), FIV (*feline immunodeficiency virus*) und SIV (*simian immunodeficiency virus*) mit nicht humaner Wirtsspezifität zugeordnet.

1.3 Die Morphologie von HIV-1

Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung eines HIV-1-Partikels. Es ist ca. 100-120 nm groß, von einer Lipiddoppelschicht umgeben, in die die viralen Env-Glykoproteine als Trimere eingebettet sind (Gelderblom, 1991). Dabei handelt es sich um das Hüllprotein gp120 (SU) und das Transmembranprotein gp41 (TM). Direkt unter der Lipiddoppelschicht, die sich von der zellulären Plasmamembran der infizierten Zelle ableitet, befindet sich eine Schicht, die den Matrixproteinen (MA, p17) zugeordnet wird. Im Zentrum des Virus befindet sich ein aus Kapsidproteinen (CA, p24) zusammengesetzter kegelförmiger Kern. Dieser enthält zwei Kopien einzelsträngiger RNA positiver Polarität mit einer Länge von ca. 9,2 kb sowie das Nukleokapsidprotein (NC, p7) und die Enzyme Reverse Transkriptase (RT, p66/p51) und Integrase (IN, p32).

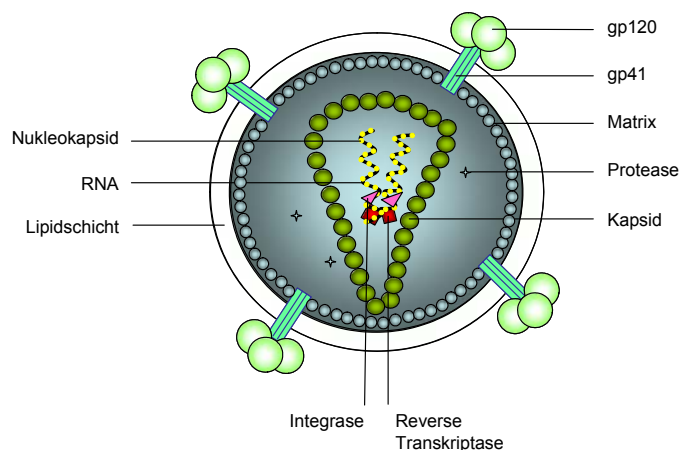


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines HIV-1-Partikels.
Detaillierte Erläuterungen im Text.

1.4 Genomstruktur, Transkripte und Proteine von HIV-1

Das Genom von HIV-1 als Vertreter der komplexen Lentiviren trägt, wie oben angesprochen, neben den klassischen retroviralen Genen *gag*, *pol* und *env*, auch die regulatorischen Gene *tat* und *rev* sowie die akzessorischen Gene *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* (siehe Abb. 1.2). Das *gag*-Gen kodiert für das pr55^{Gag}-Polyprotein, welches durch die virale Protease in die inneren Strukturproteine Matrix (MA, p17), Kapsid (CA, p24) und Nukleokapsid (NC, p7) sowie das p6-Protein gespalten wird. Die viralen Enzyme Protease (PR, p10), Reverse Transkriptase (RT, p66/p51) und Integrase (IN, p32) werden durch den *pol*-Leserahmen über eine pr160^{Gag-Pol}-Vorstufe, die ebenfalls durch die virale Protease gespalten wird, kodiert. Im Gegensatz dazu wird die *env*-kodierte gp160-Env-Vorstufe durch die zelluläre Protease Furin in die Oberflächenproteine gp120 und gp41 gespalten. Wie bei allen Retroviren wird auch bei HIV-1 die RNA durch die Reverse Transkriptase in eine doppelsträngige provirale DNA

umgeschrieben, die von LTRs (*long terminal repeats*) flankiert ist, welche Promotor- und *Enhancer*-Sequenzen enthalten.

Die viralen Proteine werden von insgesamt mehr als 30 mRNA-Spezien synthetisiert, die alle von einem primären Transkript abstammen. Dabei werden Transkripte für regulatorische Proteine gänzlich gespleißt, wogegen die später im Replikationszyklus exprimierten Strukturproteine und enzymatischen Komponenten von einfach- oder ungespleißten Transkripten translatiert werden. Eine Übersicht sämtlicher HIV-Proteine und ihrer primären Funktionen ist in Tab. 1.1 gegeben.

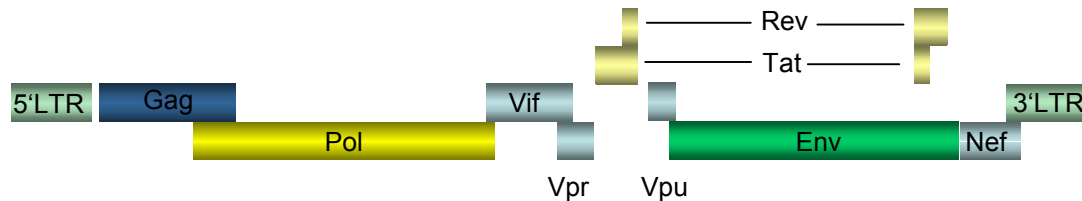


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der HIV-1-Genomorganisation.
Detaillierte Erläuterungen im Text.

Tab. 1.1: Übersicht über die viralen Proteine und deren Funktion.
Weitere Erklärungen im Text.

Protein	Bezeichnung	Funktion
Tat, p14	<i>transcriptional transactivator</i>	Effiziente Elongation der Transkription durch Bindung an TAR, Aktivierung des 5'LTR.
Rev, p19	<i>regulator of virion gene expression</i>	Transport von einfach- oder ungespleißter RNA vom Kern ins Zytoplasma = Übergang von der frühen in die späte Phase der Replikation.
Nef, p27	<i>negative factor</i>	Für die Pathogenese <i>in vivo</i> erforderlich. <i>In vitro</i> multiple Funktionen.
Vif, p27	<i>viral infectivity factor</i>	Komplexierung von APOBEC3G.
Vpr, p15	<i>viral protein r</i>	Zellzyklusarrest, Zellkernimport.
Vpu, p16	<i>viral protein u</i>	Virenfreisetzung von Plasmamembran, CD4 Degradation.
Gag, pr55	<i>group specific antigen</i>	
MA, p17	<i>matrix</i>	Virusstruktur, Bestandteil des PIC.
CA, p24	<i>capsid</i>	Konisches Kapsid.
p2		<i>spacer</i>
NC, p7	<i>nucleic-acid binding</i>	Mit viraler RNA (über Ψ) assoziiert.
p1		<i>spacer</i>
p6		Freisetzung unreifer Viruspartikel von der Zellmembran.

Gag-Pol , pr160	<i>group specific antigen-polymerase</i>	
PR , p10	<i>protease</i>	Proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine pr55 und pr160.
RT , p66/p51	<i>reverse transcriptase</i>	Reverse Transkription der viralen RNA in provirale DNA, RNaseH-Aktivität entfernt RNA-Anteil des RNA/DNA-Hybrids.
IN , p32	<i>integrase</i>	Sequenzunspezifische Integration des revers transkribierten Virusgenoms in das Wirtsgenom.
Env , gp160	<i>envelope</i>	
SU , gp 120	<i>surface</i>	Bindung an CD4 und Korezeptor CCR-5 oder CXCR-4.
TM , gp41	<i>transmembrane</i>	Fusion von viraler und zellulärer Membran.

1.5 Replikationszyklus von HIV-1

Eine Übersicht des Replikationszyklus wird in Abb. 1.3 gegeben und die einzelnen Abschnitte (1. bis zur Integration der cDNA, 2. die frühe Genexpression, 3. die späte Expression der Strukturgene mit anschließender Virusfreisetzung und 4. die Funktion der akzessorischen Proteine) in gesonderten Kapiteln beschrieben.

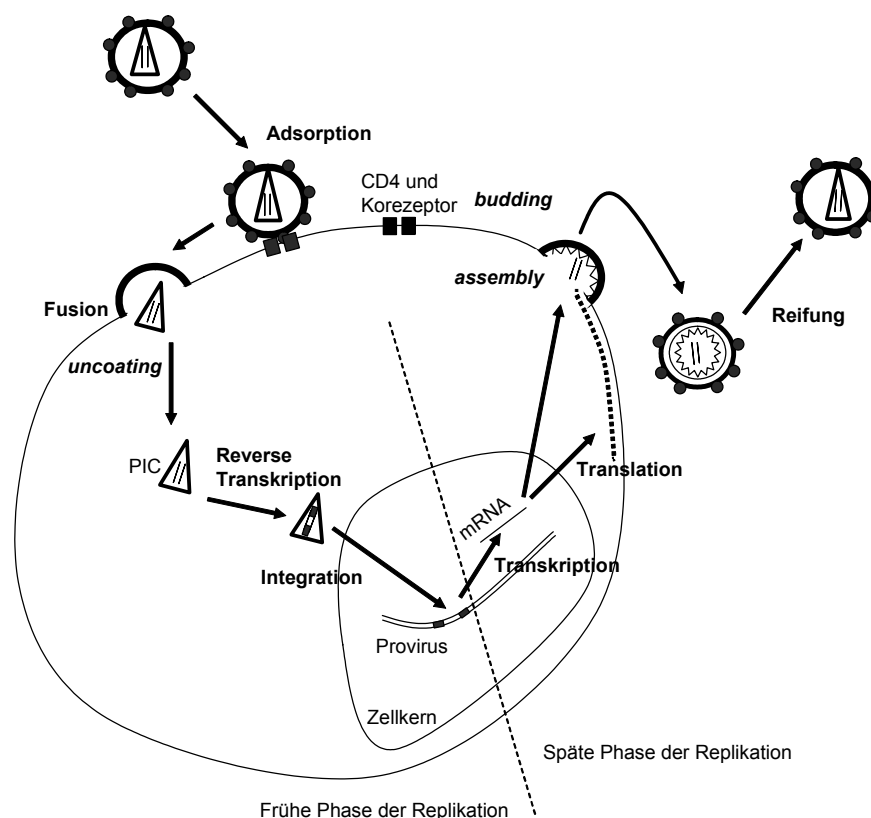


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HIV-1.
Detaillierte Erläuterungen im Text.

1.5.1 Frühe Schritte bis zur Integration des viralen Genoms

Am Anfang des Replikationszyklus bindet das Virus mit Hilfe des viralen Oberflächenproteins (Env) an den zellulären Rezeptor CD4. Konformationelle Änderungen im Env-Glykoprotein ermöglichen die Bindung an den entsprechenden Korezeptor (CXCR-4 oder CCR5). Nach weiteren konformationellen Änderungen im Env-Protein wird durch die Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran die Internalisierung des Virus in die Zelle vermittelt (unter 1.6.4 detailliert beschrieben). Bei dem an die Membranfusion anschließenden so genannten *uncoating*-Prozess wird der Präintegrationskomplex (PIC) ins Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Der PIC besteht aus der viralen RNA, den viralen Proteinen Integrase, Matrix, Vpr, Reverse Transkriptase sowie einigen zellulären Proteinen. Während des Transports des PIC über Mikrotubuli zum Kern kommt es zu einer reversen Transkription des HIV-1-Genoms zu einer doppelsträngigen DNA (cDNA), an deren Enden sich sogenannte LTRs (*long terminal repeats*) befinden. Im Gegensatz zu anderen Retroviren vollzieht HIV die Integration der linearen DNA in ein Chromosom des Wirtes auch in ruhenden Zellen. Kernlokalisationssignale (NLSs) der Integrase (Gallay *et al.*, 1997), des Matrixproteins (Bukrinsky *et al.*, 1993), von Vpr (Heinzinger *et al.*, 1994) oder von assoziierten Zellproteinen sind beteiligt an dem Transport über die Kernporen in den Zellkern. Die mit den Enden der viralen DNA assoziierte Integrase sowie zelluläre Proteine katalysieren die Reorganisation von Chromatin (*chromatin remodelling complex*) sowie die Integration des viralen DNA-Doppelstrangs in das Zellgenom.

1.5.2 Frühe Genexpression

Der 5'LTR fungiert nach der Integration in das Genom des Wirtes als eukaryotischer Promotor/*Enhancer*, während sich in dem 3'LTR die Polyadenylierungssequenz befindet. Am 5' Ende des RNA-Transkripts befindet sich das sogenannte *transactivating response* (TAR)-Element. Das TAR-Element hat eine ausgeprägte Sekundärstruktur und bindet den Transkriptions-Transaktivator Tat, was eine effiziente und vollständige Elongation der Transkription des viralen Genoms ermöglicht. Tat interagiert dabei mit einem Heterodimer aus Cyclin T1 und CDK9 (Wei *et al.*, 1998). Die Abwesenheit von Tat in der frühen Phase der Genexpression führt zu einer lediglich geringen basalen Transkription von RNA der vollen genomischen Länge. Die frühe virale Genexpression wird durch zelluläre Transkriptionsfaktoren vermittelt. Die mehrfach gespleißten mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert und bilden die Genprodukte Tat, Rev und Nef.

Rev ist ein nukleärer Exportfaktor, der beim Erreichen einer kritischen Konzentration im Nukleus an das in der *env*-Sequenz lokalisierte RRE (*rev response element*) bindet und so

den Transport von einfach gespleißten und ungespleißten Transkripten, die für die so genannten späten Genprodukte kodieren (siehe 1.5.3), durch die nukleären Poren ins Zytoplasma vermittelt (Fischer *et al.*, 1994; Malim *et al.*, 1990). Gleichzeitig erfolgt aufgrund des reduzierten Spleißens eine Verminderung der frühen Genprodukte. Somit stellt Rev eine Schlüsselrolle in der Regulation der Anteile von regulatorischen Proteinen und Strukturproteinen dar. Rev ist zur Expression der späten Genprodukte aufgrund des Vorhandenseins des RRE in diesen RNA-Transkripten erforderlich.

Das weiter unten näher beschriebene frühe Genprodukt Nef hat verschiedene Eigenschaften und spielt eine zentrale Rolle bei der Pathogenese *in vivo* (zur Übersicht: Wei *et al.*, 2003).

1.5.3 Expression der Strukturproteine und Viruszusammensetzung und -freisetzung

Von ungespleißter mRNA werden die Polyproteine **pr55^{Gag}** und **pr160^{Gag-Pol}** translatiert, welche von *gag* bzw. *pol* kodiert werden. pr160^{Gag-Pol} entsteht durch einen Leserahmenwechsel der Ribosomen während der Translation und besitzt daher einen identischen N-terminalen Bereich wie pr55^{Gag}. Dieser Leserahmenwechsel findet bei etwa 5% der Translationen statt. Durch eine Myristilierung am N-terminalen Bereich des Polyproteins (Wilcox *et al.*, 1987) und durch basische Aminosäuren in Matrix (Massiah *et al.*, 1994) werden die Proteine an die Zellmembran dirigiert (Bryant und Ratner, 1990; Gottlinger *et al.*, 1989).

Bei dem Env- oder gp160-Vorläuferprotein (**gp160^{Env}**) handelt es sich ebenfalls um ein spätes Genprodukt, das von einem einfach gespleißten Transkript synthetisiert wird. Es wird von einer bizistronischen Vpu/Env-mRNA am rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) translatiert (Vpu siehe 1.5.4). Nach zahlreichen Glykosylierungen wird das Env-Vorläuferprotein in den Golgi-Apparat transportiert und durch die zelluläre Protease Furin in die aktiven Untereinheiten gp120 und gp41 gespalten (siehe auch 1.6.2) und schließlich in die Plasmamembran integriert.

Bei der Partikelmorphogenese assoziieren RNA-Dimere über das RNA-Verpackungssignal Ψ (Clavel und Orenstein, 1990; Luban und Goff, 1994) mit in die Plasmamembran verankerten Gag- und Gag-Pol-Polyproteinen. Die Rekrutierung essentieller zellulärer Faktoren wie Tsg101 und dessen Bindung an die L-Domäne (LD) von p6 (Garrus *et al.*, 2001) führen schließlich zum Abschnürungsprozess unreifer viraler Partikel (*budding* = Knospung). Die proteolytische Prozessierung der Gag- und Pol-Proteine erfolgt direkt nach der Abschnürung des unreifen HI-Virions. Dabei werden durch die dimerisierte virale Protease die Proteine MA (p17), CA (p24), NC (p7) und p6 für den Gag-Vorläufer und PR (p10), RT (p66/51) und IN (p31) für den Pol-Vorläufer aus dem Polypeptid geschnitten. Zwei *Spacer*-Proteine, p2 und p1, werden außerdem zwischen CA und NC bzw. zwischen NC und LD herausgetrennt.

Einige akzessorische virale Proteine (Vpr, Vpu, Nef) sowie einige zelluläre Komponenten (z.B. MHCI und II) (Saarloos *et al.*, 1997) werden neben den bereits beschriebenen Proteinen ebenfalls in Viren eingebaut.

1.5.4 Die akzessorischen Proteine

Sämtliche akzessorische Proteine (Nef, Vpr, Vpu und Vif) werden, zumindest in bestimmten T-Zelllinien, nicht für eine erfolgreiche *in vitro*-Replikation benötigt, sind aber für die Virulenz *in vivo* erforderlich.

Bei dem unter allen Lentiviren (außer EIAV, *equine infectious anemia virus*) vorkommenden **Vif** (*viral infectivity factor*)-Protein handelt es sich um ein Protein, welches den zellulären Faktor APOBEC3G komplexiert (Mariani *et al.*, 2003; Sheehy *et al.*, 2002). APOBEC3G ist eine Deaminase, die zu Deaminierungen (C→U) in der Minusstrang-DNA viraler reverser Transkripte führt. Die Folge sind Degradationen der viralen cDNA oder die Bildung letaler Hypermutationen (Zhang *et al.*, 2003). Die Bindung von Vif an diese Deaminase induziert dessen Degradierung im Proteasom (Marin *et al.*, 2003), so dass keine Enkapsidierung von APOBEC3G in neu gebildete Virionen stattfinden kann.

Funktionen von **Vpr** (*viral protein r*) sind die Induktion des Zellzyklusarrests in der G2-Phase (Rogel *et al.*, 1995), das Mitwirken am Transport des PIC in den Zellkern (Heinzinger *et al.*, 1994) sowie die Teilnahme an der frühen, Tat-unabhängigen, vom 5'LTR gesteuerten Gen-Expression (Cohen *et al.*, 1990; Sawaya *et al.*, 1998).

Vpu (*viral protein u*) wird mit einer effizienten Virusproduktion in Verbindung gebracht (Klimkait *et al.*, 1990). Dabei wurde beobachtet, dass das Virus in Abwesenheit von Vpu an der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln verbleibt. Zusätzlich induziert Vpu durch eine Induktion der Ubiquitylierung von CD4 dessen Degradation (Willey *et al.*, 1992a) und dadurch die Dissoziation von intrazellulären Interaktionen von gp160- mit CD4-Molekülen (Willey *et al.*, 1992b). Somit wird ein erhöhter Transport von Env-Glykoproteinen zur Plasmamembran bewirkt.

Entgegen früherer Veröffentlichungen, auf denen die Namensgebung des Proteins **Nef** (*negative factor*) beruht und die eine verminderte Virusreplikation durch eine Suppression der Replikation beschreiben (Ahmad und Venkatesan, 1988), ist mittlerweile bewiesen, dass, je nach Zelltyp, Nef entweder keinen oder einen steigernden Einfluss auf die Replikation besitzt. Es wurden unterschiedliche Funktionen des sehr früh während der Infektion gebildeten Virusproteins beschrieben. Die wichtigsten sind das Herunterregulieren von CD4- (Garcia und Miller, 1991) und MHCI-Molekülen (Schwartz *et al.*, 1996) von der Zelloberfläche und die Fähigkeit, in zelluläre Signalkaskaden einzugreifen (zur Übersicht: Doms und Trono, 2000).

1.6 Die HIV-1-Env-Glykoproteine

Das HIV-1-Env-Glykoprotein spielt eine zentrale Rolle bei der Replikation des Virus. Wie oben kurz erläutert, bindet HIV-Env an CD4 und den Korezeptor (CXCR-4 oder CCR-5) auf der Zielzelle und vermittelt die Fusion zwischen der viralen und zellulären Membran.

1.6.1 Struktur von HIV-1-Env

Abb. 1.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Regionen des 856 Aminosäuren langen Env-Glykoproteins.

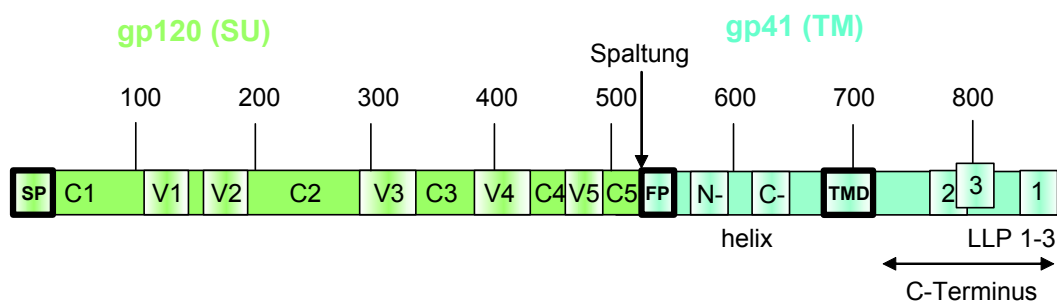


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der funktionellen Bereiche im HIV-1-Glykoprotein.

SP = Signalpeptid, FP = Fusionspeptid, TMD = Transmembrandomäne. Detaillierte Erläuterungen im Text.

gp120 (Env-SU) besteht aus dem Signalpeptid am N-Terminus und fünf hypervariablen Regionen (V1-V5), die durch Disulfidbrücken in schleifenförmigen Strukturen vorliegen (Leonard *et al.*, 1990) und von fünf konservierten Regionen unterbrochen sind (C1-C5) (Starcich *et al.*, 1986). Innerhalb der C2-C4-Region liegt die Bindestelle für den zellulären HIV-1-Rezeptor CD4 (Lasky *et al.*, 1987). Die V3-Schleife bildet einen Teil der Korezeptorbindungsstelle (Trkola *et al.*, 1996a) und ist für den CXCR-4- oder CCR-5-Zelltropismus verantwortlich (Milich *et al.*, 1993).

Bei **gp41** (Env-TM) handelt es sich um ein Typ I-Membranprotein, das über eine etwa 20 Aminosäuren lange Transmembrandomäne (TMD) in der Zell- bzw. Virusmembran verankert ist. Am N-terminalen Ende der Ektodomäne befindet sich das ebenfalls ca. 20 Aminosäuren lange hydrophobe Fusionspeptid (FP) (Freed *et al.*, 1990), welches für die Fusion von Virus- und Zellmembran verantwortlich ist. Es wird nach Rezeptor- und Korezeptorbindung in die Plasmamembran der zu infizierenden Zielzelle inseriert (Wyatt und Sodroski, 1998). C-terminal des Fusionspeptids liegen die ebenfalls am Fusionsprozess beteiligten so genannten N- und C-Helixe. Der mit 151 Aminosäuren ungewöhnlich lange C-Terminus (CT) von gp41 enthält unter anderem α -helikale, hydrophobe Regionen, die so

genannten *lentiviral lytic peptide*-Domänen (kurz LLP) (Andreassen *et al.*, 1990), über die er mit der Plasmamembran der Zelle assoziiert ist (Haffar *et al.*, 1991a). Die Bezeichnung LLP basiert auf den destabilisierenden und permeabilisierenden Eigenschaften synthetischer Peptide, die diese Aminosäuresequenz repräsentieren (Chernomordik *et al.*, 1994; Kliger und Shai, 1997; Srinivas *et al.*, 1992). Im Env-CT sind außerdem mehrere potentielle Endozytosesignale enthalten. Eines davon beruht auf einem Tyrosin-abhängigen Motiv (YXXΦ) und besitzt Funktionalität (Boge *et al.*, 1998; Rowell *et al.*, 1995), während von fünf Dileucin-abhängigen Endozytosesignalen nur eines bisher als funktionell aktiv beschrieben wurde.

1.6.2 Biosynthese von HIV-1-Env

gp160 wird in der späten Phase der Genexpression von einer bizistronischen mRNA synthetisiert. Das am N-Terminus des gp160-Vorläuferproteins liegende, 28-30 Aminosäuren lange Signalpeptid delegiert das wachsende Polyprotein zum Endoplasmatischen Retikulum, wo es nach Translokation in dessen Lumen durch eine zelluläre Signalpeptidase abgespalten wird. An über 20 Asn-X-Ser/Thr-Glykosylierungsstellen, 13 davon in verschiedenen Virusisolaten hochkonserviert, kommt es kotranslational zu einer N-Glykosylierung. Etwa die Hälfte der Molekülmasse von gp160 ist durch Oligosaccharidseitenketten bedingt. Ebenfalls im Lumen des ER bindet gp160 an zelluläre BiP/GRP78-Chaperone, was zur Bildung von neun Disulfidbindungen zwischen den 18 Zysteinresten (Leonard *et al.*, 1990) und zur Oligomerisierung zu Dimeren führt (Earl *et al.*, 1991). Nach dem Transport des Vorläuferproteins zum Golgi-Komplex und Modifikationen in den Oligosaccharidseitenketten (Leonard *et al.*, 1990; Mizuochi *et al.*, 1990) spaltet Furin (Hallenberger *et al.*, 1992), eine Subtilisin-ähnliche, eukaryotische Protease, gp160 am stark konservierten Arg-X-Lys-Arg-Motiv (Bosch und Pawlita, 1990) in die Untereinheiten gp120 (Env-SU) und gp41 (Env-TM). Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die Fusionsaktivität des Glykoproteins und die Virusinfektiosität (McCune *et al.*, 1988b). Im Anschluss an die Spaltung bleiben gp120 und gp41 nicht kovalent miteinander assoziiert (Helseth *et al.*, 1991) und werden über das zelluläre vesikuläre Transportsystem zur Plasmamembran delegiert. Ein größerer Teil des ungespaltenen gp160 wird in Lysosomen degradiert (Willey *et al.*, 1988). Aufgrund der nur schwachen Assoziation zwischen gp120 und gp41 wird vermutlich ein Teil der gp120-Untereinheiten in der Plasmamembran der Zelle oder nach dem Abschnürungsprozess der Virionen in der viralen Lipidschicht beim so genannten *shedding* von der gp41-Untereinheit abgetrennt und in die Umgebung abgegeben.

1.6.3 Einbau von HIV-1-Env in Virionen

Die genauen Mechanismen, die zum Einbau von Env-Glykoprotein in HIV-1-Virionen führen, sind bis heute weitgehend ungeklärt. Einige veröffentlichte Daten deuten darauf hin, dass die direkte Interaktion des in der Länge hochkonservierten C-Terminus von gp41 mit der Matrix-domäne des ungespaltenen Gag-Proteins eine Rolle dabei spielt. So verhindern bestimmte Mutationen in der Matrix den Einbau von Wt-HIV-Env in Virionen (Freed und Martin, 1995; Freed und Martin, 1996; Yu *et al.*, 1992). Allerdings kann dieser Einbaufekt durch Trunkation des HIV-1-Env C-Terminus oder durch Pseudotypisierung mit heterologen Env-Glykoproteinen mit kurzen C-Termini aufgehoben werden (Freed *et al.*, 1995; Freed *et al.*, 1996; Mammano *et al.*, 1995). Es existiert aber auch eine Anzahl von Publikationen, die darauf hindeuten, dass kein Zusammenhang zwischen der Interaktion von Matrix und Env-Glykoprotein und dessen Einbau in Virionen besteht. So konnte gezeigt werden, dass zum einen C-terminale Trunkationen nicht zum Verlust des Env-Einbaus führen (Gabuzda *et al.*, 1992; Wilk *et al.*, 1992; Wilk *et al.*, 1996), und dass es zum anderen bei gleichzeitiger Anwesenheit von Env-Proteinen mit C-terminalen Trunkationen und Env-Proteinen voller Länge nicht zum bevorzugten Einbau von Wt-Env kommt (Henriksson, 1999).

Es wird eine Rolle von so genannten *lipid rafts* beim Env-Glykoproteineinbau (Rousso *et al.*, 2000) und dem *assembly* und *budding* (Lindwasser und Resh, 2001; Nguyen und Hildreth, 2000; Ono und Freed, 2001) diskutiert. Bei *lipid rafts* handelt es sich um geordnete, durch Interaktionen von verschiedenen Lipiden (Cholesterol, Sphingomyelin, Glykosphingolipide) gebildete Domänen der Lipiddoppelschicht. Sie sind reich an GPI-geankerten Proteinen und Molekülen der Signalübertragung. Ein konserviertes, palmitoyliertes Motiv des Env-CT könnte für die mögliche Lokalisierung von HIV-Env in *lipid raft*-Mikrodomänen der Zellmembran verantwortlich sein (Rousso *et al.*, 2000), obwohl eine neuere Publikation diese Befunde in Frage stellt (Chan *et al.*, 2005).

1.6.4 HIV-1-Env während des Fusionsprozesses

Obwohl im Folgenden und in Abb. 1.5 der Klarheit und Übersichtlichkeit halber die Fusion anhand von nur einem Env-Trimer mit jeweils einem Rezeptor- und Korezeptor-Molekül beschrieben wird, gibt es Daten, die am Fusionsprozess und der Bildung der Fusionspore mehrere Env-Trimere, mehrere CD4-Moleküle, und mehrere CXCR-4-Moleküle bzw. CCR-5-Moleküle (Kuhmann *et al.*, 2000) beteiligt sehen. Zudem ist es möglich, dass der Fusionsprozess dieser Env/CD4/Korezeptor-Cluster an *lipid rafts* abläuft (zur Übersicht: Brown und London, 1998).

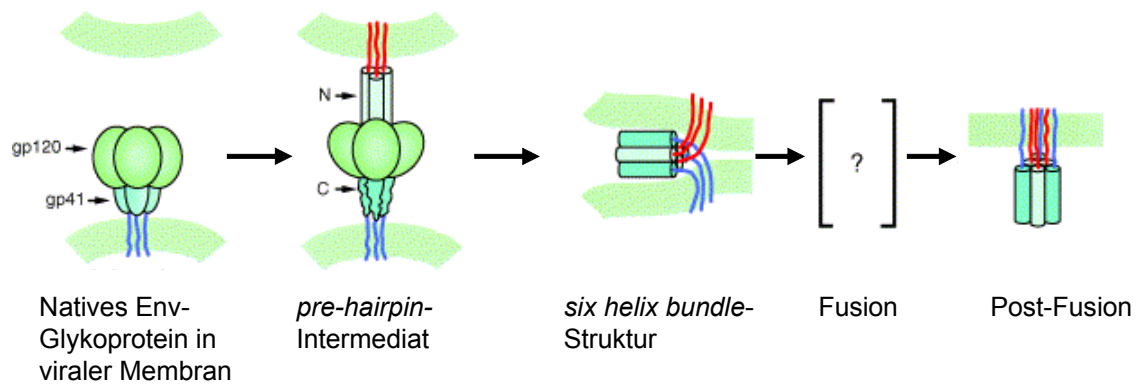


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der HIV-1-Env-vermittelten Membranfusion.

Detaillierte Erläuterungen im Text. Verändert nach Gallo *et al.*, 2003.

Obwohl die Bindung von gp120 an CD4 selbst noch keinen Fusionsprozess auslöst (Chesebro *et al.*, 1990), bewirkt die CD4-Bindung konformationelle Änderungen in gp120. Danach binden die V3-, V1- und V2-Domänen von gp120 an den Korezeptor CXCR-4 (X4-Stämme) oder CCR-5 (R5-Stämme). Die Konformation von gp41 ist vermutlich vor der Fusion metastabil und wird durch die Assoziation mit gp120 stabilisiert. Ausgelöst durch die Korezeptorbindung kommt es in gp41 zu konformationellen Änderungen und zur Bildung des so genannten *pre-hairpin*-Intermediats. Dabei wird das hydrophobe, N-terminale Fusionspeptid (FP) von gp41 exponiert. Obwohl es derzeit noch keinen Beweis dieser Struktur während der Env-vermittelten Fusion gibt, legen es Vergleiche mit der HA-vermittelten Fusion von Influenza sehr nahe (Stegmann *et al.*, 1991; Tsurudome *et al.*, 1992). Das Fusionspeptid inseriert in die Plasmamembran der Zielzelle, was zur Ausbildung der so genannten *six helix bundle*-Struktur führt. Dabei handelt es sich um *coiled coil*-Strukturen der N-Helixe, die sich im Inneren der *six helix bundle* (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997) befinden und an deren hydrophoben Vertiefungen der Sekundärstruktur sich die C-Helixe anordnen. Strukturen, die unmittelbar vor und nach der *six helix bundle*-Konformation auftreten, konnten bisher nicht eindeutig beschrieben werden. Die Bildung dieser Struktur ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Fusion (Melikyan *et al.*, 2000).

1.7 Immunologie der HIV-1-Infektion

1.7.1 Verlauf einer HIV-1-Infektion in Patienten

Der Infektionsverlauf von HIV-1 lässt sich in drei klinische Phasen einteilen (siehe Abb. 1.6): die Primärinfektion oder Akutphase, die Latenz- oder asymptomatische Phase und das Stadium AIDS mit dem damit verbundenen Krankheitsbild.

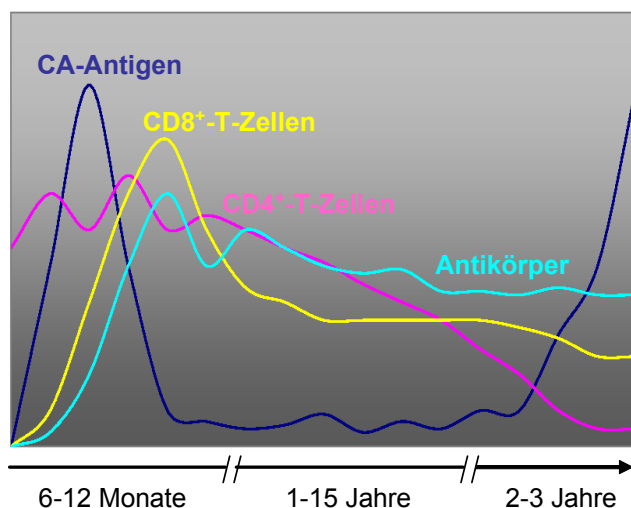


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Infektionsverlaufs einer HIV-1-Infektion.

Gezeigt ist die Beziehung zwischen der Konzentration des HIV-1-CA-Antigens (blau), der Anzahl von $CD4^+$ - (pink) und spezifischen $CD8^+$ -T-Zellen (gelb) und dem Titer von Antikörpern gegen virale Proteine im Blut eines Patienten bei einer unbehandelten HIV-1-Infektion.

In den ersten Tagen nach einer Infektion, nachdem infizierte Zellen (meist Makrophagen) in die nächstliegenden Lymphknoten transportiert wurden, wird das Virus in großen Mengen produziert, was in einigen Patienten zu Lymphknotenschwellungen und zu grippeähnlichen Symptomen führen kann. In dieser Phase sind durchschnittlich etwa 5000 infektiöse HIV-Partikel (IU, infectious units) pro μ l Plasma nachweisbar. Die hohe Virämie wird innerhalb weniger Wochen nach dieser so genannten **Akutphase** vor allem durch spezifische $CD8^+$ -T-Lymphozyten, die zeitlich vor neutralisierenden Antikörpern detektierbar sind, größtenteils unter Kontrolle gebracht (siehe 1.7.3.1). Die Anzahl der $CD4^+$ -T-Zellen im Blut sinkt während dieser frühen Phase leicht ab, nimmt später allerdings wieder normale Werte an. Jedoch zeigen neuere Ergebnisse, dass sehr früh im Infektionsverlauf ein beträchtlicher Teil der $CD4^+$ -Gedächtnis-T-Zellen in der Darmschleimhaut infiziert und eliminiert wird (Brenchley *et al.*, 2004; Mehndru *et al.*, 2004). Die Anzahl dieser Zellen erhöht sich danach nur noch geringfügig.

Einige Monate nach der Infektion beginnt die so genannte **asymptomatische Phase**, die viele Jahre dauern kann. In diesem Stadium sinkt die Virämie auf unter 200 IU/ μ l mit einem gelegentlichen Anstieg auf 500 IU/ μ l. Dies bedeutet aber nicht, dass die Virusreplikationsrate

gering ist. Kinetische Analysen der Viruseliminierung bzw. der Erhöhung der CD4⁺-T-Zell-Population nach Anwendung der antiviralen Therapie (HAART) deuten darauf hin, dass auch in der asymptomatischen Phase Virusreplikation auf einem sehr hohen Niveau stattfindet und dass ein Gleichgewicht zwischen der CD4⁺-T-Zell-Eliminierung und der CD4⁺-T-Zell-Produktion besteht (Ho *et al.*, 1995).

Es ist bekannt, dass die viralen Titer in Patienten zu dieser Zeit Einfluss auf die Entwicklung des Krankheitsverlaufs haben. Je höher die Viruslast, desto schneller kommt es zum Ausbruch von AIDS. Während der asymptomatischen Phase ist durch die fortschreitende Virusreplikation eine langsamere Verringerung der Zahl an CD4⁺-T-Zellen zu beobachten (um ca. 60 CD4⁺-Zellen/µl/Jahr ausgehend von einer Gesamtzahl von ca. 1000 Zellen/µl im Blut), während die Anzahl der CD8⁺-Zellen bei ca. 1000 Zellen/µl nahezu konstant bleibt. Die Viruspopulation wird durch die andauernde Selektion spezifischer Mutanten als Resultat der immunologischen Kontrolle heterogener.

In der letzten Phase des Krankheitsverlaufs, wenn der infizierte Patient das Krankheitsbild **AIDS** entwickelt, sinkt die Zahl der CD4⁺-T-Zellen unter 200 Zellen/µl, die Anzahl der CD8⁺-T-Zellen verringert sich und die Anzahl infektiöser Partikel steigt auf über 5000 IU/µl. T-trope Viren mit hoher Virulenz und schneller Replikationskinetik dominieren. Infektionen von opportunistischen Erregern (*Pneumocystis*, *Toxoplasma*, *Candida*, CMV) und das Auftreten maligner Tumore (Kaposi-Sarkom) und neurologischer Symptome (Demenzsyndrom, Gehirnatrophie) sind charakteristisch für das Vollbild AIDS.

1.7.2 Probleme bei der Kontrolle einer HIV-Infektion durch das Immunsystem

Eine zentrale, bis heute nicht endgültig geklärte Frage ist, warum die Replikation des HI-Virus trotz der Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort nach der Primärinfektion nicht vollständig unter Kontrolle gebracht werden kann. Die Gründe dafür sind vielfältig. Zum einen wird durch die hohe Fehlerrate der Reversen Transkriptase und die hohe Replikationsrate sowie durch den Selektionsdruck des Immunsystems die Bildung so genannter *escape*-Mutanten vorangetrieben. Solche *escape*-Mutanten sind resistent gegenüber zirkulierenden Antikörpern und CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten. Somit bleibt die Wirksamkeit des Immunsystems ständig hinter der des Virus zurück.

Zum anderen hat das Virus mehrere Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems entwickelt. So sind konservierte funktionelle Domänen im viralen Glykoprotein durch variable Bereiche an der Oberfläche des Proteins und durch eine starke Glykosylierung geschützt.

Weiterhin ist es nachteilig, dass HIV gerade die Zellen infiziert und eliminiert (CD4⁺-T-Helferzellen), die für eine effiziente Immunantwort benötigt werden (Douek *et al.*, 2002; McNeil *et al.*, 2001).

Für die Immunabwehr, aber vor allem bei der antiviralen Chemotherapie ist die Tatsache von Bedeutung, dass in einem kleinen Teil der infizierten Zellen (vor allem ruhende CD⁺-T-Zellen) das Virus latent ist. Diese Zellen werden nicht als infiziert erkannt und können nach vielen Jahren zur Virusproduktion angeregt werden.

1.7.3 Die adaptive Immunantwort bei Virusinfektionen

Es werden zwei Mechanismen zur Immunabwehr unterschieden. Zum einen gibt es die unspezifische, nichtadaptive Immunantwort und zum anderen die adaptive Immunantwort, die die humorale (B-Lymphozyten-) und zelluläre (T-Lymphozyten-vermittelt) Immunantwort beinhaltet.

1.7.3.1 Die zelluläre Immunantwort

Bei den an der zellulären Immunantwort beteiligten Lymphozyten handelt es sich um CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (ZTLs) und T-Helferzellen der Klasse I (T_H1-Zellen).

HIV-spezifische ZTLs erkennen virusinfizierte Zellen und lysieren diese mit Hilfe von Perforin und Granzymen. Die CD8⁺-Lymphozyten lagern sich dabei über den TZR (T-Zell-Rezeptor)-Komplex und den CD8-Rezeptor an MHC-Klasse-I-Moleküle auf infizierten Zellen an, welche Peptidabschnitte viraler Proteine als Fremdkomponenten präsentieren. Die Beladung der MHC-Klasse-I-Proteine mit den Fremdpeptiden erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum und erfordert somit eine Neusynthese der viralen Proteine.

Spezifische T_H1-Zellen aktivieren bei der zellulären Immunantwort zudem überwiegend Makrophagen, die Erreger aufgenommen haben, und regen diese zum Abtöten der Erreger an. Fremdpeptide auf MHC-Klasse-II-Molekülen der Makrophagen werden dabei spezifischen T-Zell-Rezeptoren der T_H1-Zellen präsentiert. Diese wiederum reagieren auf die Interaktion mit der Freisetzung verschiedener Zytokine und fördern vor allem durch IL-2 und INF γ die Aktivierung weiterer T-Helferzellen, zytotoxischer T-Zellen und Makrophagen.

Bei einer HIV-Infektion vermitteln ZTLs in Patienten eine partielle Kontrolle der viralen Replikation während der akuten Phase. Dabei werden ZTLs gegen Peptide verschiedener viraler Proteine (Gag, Env, Nef) gebildet. Dem Anstieg spezifischer ZTLs folgt ein Rückgang der viralen RNA im Plasma (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994). Auch in SIV-infizierten Makaken gibt es eine Korrelation zwischen der Expansion spezifischer ZTLs und einer Reduktion viraler Partikel im Serum (Kuroda *et al.*, 1999; Yasutomi *et al.*, 1993).

Die Rolle der ZTLs wurde auch experimentell bei einer Depletion von ZTLs durch eine Infusion monoklonaler CD8-Antikörper in SIV-infizierten Makaken deutlich. Diese

Behandlung resultiert in einer deutlich verstärkten SIV-Replikation (Jin *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1999).

Die Bedeutung von ZTLs wird auch in Studien von so genannten *long-term nonprogressors* deutlich. Dabei handelt es sich um HIV-infizierte Menschen, die auch nach vielen Jahren ohne Therapie keine Anzeichen von AIDS zeigen. Einige solcher Patienten haben signifikant höhere HIV-1-spezifische ZTL-Titer als normale Patienten (Cao *et al.*, 1995). In diesem Zusammenhang gibt es eine weitere interessante Gruppe von Personen, nämlich eine kleine Gruppe afrikanischer Prostituierten, die trotz einer häufigen HIV-1-Exposition nicht infiziert werden. Auch in diesen Personen wird der Einfluss HIV-1-spezifischer ZTL-Aktivitäten bei der Kontrolle der HIV-Infektion vorgeschlagen (Kaul *et al.*, 2000; Rowland-Jones *et al.*, 1995).

1.7.3.2 Die humorale Immunantwort

Patienten mit einer HIV-Infektion entwickeln eine hohe Konzentration von durch B-Zellen freigesetzten HIV-spezifischen Antikörpern. Prinzipiell können Antikörper sowohl gegen freie Viren als auch gegen infizierte Zellen wirken, wobei die Neutralisation freier Viruspartikel den Großteil der antiviralen Aktivität ausmacht.

Nach Kontakt des humoralen Immunsystems mit HI-Viren bindet das auf spezifischen Prä-B-Zellen membranständige IgM-Molekül meist konformationelle Epitope viraler Proteine. Nach der Aufnahme des Antigen-Antikörper-Komplexes werden die HIV-Proteine im Endosom abgebaut, die resultierenden Peptide des Antigens binden dort an MHC Klasse II-Proteine und gelangen so zurück an die Zelloberfläche. In dieser Phase wird die Prä-B-Zelle zur Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) und präsentiert lineare HIV-Epitope, an die T-Helferzellen der Klasse II mit der entsprechenden Spezifität der T-Zell-Rezeptoren binden und daraufhin Zytokine (IL-4, IL-5 sowie andere Effektormoleküle) freisetzen. Die B-Zellen werden dadurch zur Proliferation und Differenzierung zu Plasmazellen und Gedächtniszellen angeregt. Hier erfolgt auch der Wechsel der produzierten Immunglobulinklassen (*switch*).

Innerhalb einer HIV-Infektion sind nur Antikörper gegen das Env-Protein von Bedeutung, da sämtliche neutralisierende Antikörper Epitope von gp120 oder gp41 erkennen (u.a. in der V3-Domäne von gp120) (Broliden *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 1987). Antikörper HIV-infizierter Patienten zeigen aber nur eine geringe Neutralisationseffizienz gegenüber primären HIV-1-Isolaten (Moog *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1995a) und sind nicht in der Lage, das im Patienten zirkulierende Virus zu neutralisieren (Moog *et al.*, 1997), obgleich sie in recht hohen Titern vorkommen.

Obwohl Antikörper in einer natürlichen Infektion nicht vor HIV schützen können, verhindern doch Serumantikörper oder ein Gemisch monoklonaler, neutralisierender Env-Antikörper bei

einer passiven Immunisierung in Versuchstieren eine HIV-Infektion oder verringern zumindest hohe Virustiter (Baba *et al.*, 2000; Haigwood *et al.*, 1996; Mascola *et al.*, 2000). Die dabei zum Teil verwendeten monoklonalen Antikörper (siehe Kapitel 1.7.4) wurden aus HIV-infizierten Personen isoliert und zeigen eine breite Neutralisationsaktivität gegen HIV-Laborstämme und -Primärisolate (Kreuzneutralisation). Das Vorkommen solcher Antikörper zeigt, dass durch die Induktion dieser oder ähnlicher Antikörper ein effizientes prophylaktisches Vakzin im Prinzip generiert werden könnte.

1.7.4 Kreuzneutralisierende Antikörper

Im Folgenden werden die Epitope der wenigen bisher isolierten, kreuzneutralisierenden Antikörper beschrieben (siehe Abb. 1.7). Bisher wurden zwei gp120- und drei gp41-Antikörper mit kreuzneutralisierender Wirkung aus HIV-positiven Patienten gewonnen.

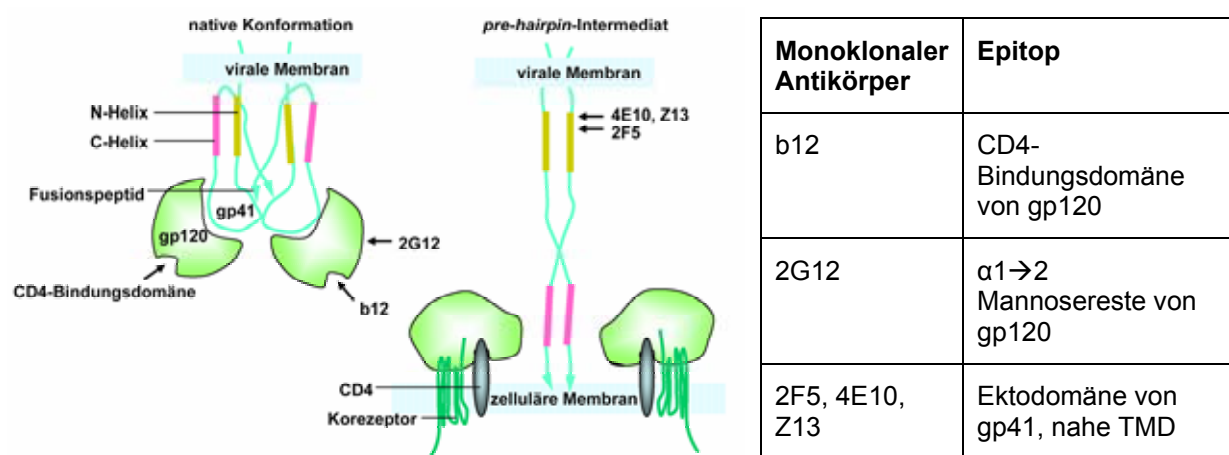


Abb. 1.7: Kreuzneutralisierende Antikörper und deren Epitope.

Detaillierte Erläuterungen im Text. Siehe auch 1.6.4.

b12 ist gegen ein Epitop gerichtet, welches mit der CD4-Bindungsstelle überlappt (Burton *et al.*, 1994; Roben *et al.*, 1994; Saphire *et al.*, 2001). Dieser monoklonale Antikörper neutralisiert Labor- und Primärisolate (Binley *et al.*, 2004; Burton *et al.*, 1994). Viele weitere Antikörper gegen diese hochkonservierte, konformationelle Region zeigen nur eine Neutralisation von Laborisolaten (Karwowska *et al.*, 1992).

2G12 bindet an eine zuckerreiche Region von gp120 (Sanders *et al.*, 2002a; Scanlan *et al.*, 2002; Trkola *et al.*, 1996b), wobei $\alpha 1 \rightarrow 2$ Mannosereste beteiligt sind. Es ist nicht bekannt, ob dieses Epitop an der Virusadhäsion oder der Fusion beteiligt ist. Jedenfalls sind 2G12 Antikörper fähig, eine große Anzahl von Labor- und Primärisolaten zu neutralisieren (Buchacher *et al.*, 1994; Kwong *et al.*, 1998; Scanlan *et al.*, 2002; Trkola *et al.*, 1996b).

Die drei bekannten kreuzneutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5, 4E10 und Z13 gegen gp41 erkennen Epitope in der Ektodomäne nahe der Transmembrandomäne. Diese

Antikörper zeigen kreuzneutralisierende Eigenschaften gegen Labor- und Primärisolate (Binley *et al.*, 2004).

1.8 Tierexperimentelle Systeme

Vor der klinischen Untersuchung eines Vakzins wird es in Versuchstieren auf seine Fähigkeit zur Induktion einer Immunantwort analysiert. Dabei wird zwischen Tieren unterschieden, die mit dem Erreger nicht infiziert werden können (meist kleine Nagetiere) und denen, die mit diesem oder einem tierspezifisch verwandten Erreger infizierbar sind und unter Umständen Krankheitssymptome entwickeln. In diesem Fall können neben *in vitro*-Analysen von Seren und Immunzellen so genannte *challenge*-Versuche durchgeführt werden. Dazu werden immunisierte Tiere mit dem Erreger infiziert und der Verlauf der Infektion bzw. der Verlauf der Krankheit mit dem nicht immunisierter Tiere verglichen. In der HIV-Vakzinforschung werden je nach Entwicklungsstadium und Strategie des Vakzins verschiedene Versuchstiere verwendet.

1.8.1 Mit HIV nicht infizierbare Tiere

Viele potentielle Vakzine werden im frühen Stadium der Entwicklung vor allem in kleinen Nagetieren (hauptsächlich Mäusen und Ratten) analysiert. Die Tiere eignen sich besonders gut aufgrund ihrer geringen Körpergröße, eines niedrigen Unterbringungsaufwands, eines gut charakterisierten Immunsystems und des Vorhandenseins zahlreicher Reagenzien und standardisierter Methoden. Nach Immunisierungen können induzierte Antikörper und Immunzellen allerdings nur *in vitro* auf ihre Fähigkeit, das Virus bzw. infizierte Zellen zu neutralisieren bzw. zu lysieren, analysiert werden.

1.8.2 Mit HIV bzw. SIV/SHIV infizierbare Tiere

1.8.2.1 Schimpansen

Außer dem Menschen können im Prinzip nur noch Schimpansen mit HIV infiziert werden. Die Tiere entwickeln allerdings äußerst selten das Krankheitsbild AIDS. Die Tatsache, dass es deutliche Unterschiede zwischen dem Verlauf einer HIV-1-Infektion im Menschen und im Schimpansen gibt, ist somit, neben den hohen Kosten und dem hohen Aufwand der Haltung dieser in der Natur gefährdeten Spezies, ein Grund dafür, dass Schimpansen eher selten als Versuchstiere verwendet werden.

1.8.2.2 SIV/SHIV-Modell

Mehrere nicht humane Primatenspezies werden mit HIV-verwandten Affenviren (*simian immunodeficiency virus*, SIV) infiziert. SIV^{mac} infizierte Rhesusaffen (Makaken) entwickeln dabei eine AIDS-ähnliche Krankheit. Die Verwendbarkeit des Makaken/SIV-Modells liegt vorrangig in der Analyse verschiedener Vakzinierungsstrategien. Derzeit werden vor allem DNA-Vakzine basierend auf *gag*, *pol* und *nef* getestet.

Darüber hinaus können Makaken auch mit einem chimären SIV-HIV-1-Virus (SHIV) infiziert werden. Dabei handelt es sich um veränderte SI-Viren, die anstelle des SIV-Env- das HIV-1-Env-Glykoprotein auf der Oberfläche tragen. Auch hier kommt es in den meisten Fällen nach einer Infektion zum Ausbruch einer Krankheit. In diesem Modell werden vorrangig Vakzinierungsstrategien untersucht, die auf der Induktion neutralisierender Antikörper gegen das HIV-1-Env-Glykoprotein basieren.

1.8.2.3 Manipulierte Nagetiermodelle

Ein in der HIV-Forschung ebenfalls verwendetes Tierversuchssystem sind die so genannten Xenotransplantationsmodelle. Hierbei werden humane Zellen oder Gewebe, überwiegend PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) (Mosier *et al.*, 1988), fetale Leber oder fetaler Thymus (McCune *et al.*, 1988a; Mosier, 1991), in SCID- (*severe combined immunodeficiency*) Mäuse übertragen. Transplantierte Zellen oder Organe ermöglichen in einigen Studien eine erfolgreiche HIV-1-Replikation.

Vielfältige Bestrebungen sind unternommen worden, um infizierbare Kleintiermodelle, insbesondere Mäuse- und Ratten, zu entwickeln. Es wurden huCD4/huKorezeptor transgene Mäuse bzw. Mäusezellen hergestellt. Darin kam es zu deutlich höheren Infektionseffizienz, allerdings konnte keine Produktion infektiöser Viren beobachtet werden (Browning *et al.*, 1997). Die Expression von huCycT1 in murinen Zellen und somit die Umgehung von *post-entry*-Restriktionen durch eine hergestellte Tat-Funktionalität führt schließlich zu einem bis zur Integration und proviralen Genexpression funktionellen Replikationszyklus, in dem allerdings weiterhin keine signifikanten Mengen funktioneller Viren produziert werden (Bieniasz und Cullen, 2000; Mariani *et al.*, 2000).

In huCD4 und huKorezeptor transgenen Rattenzellen finden dagegen, wie bei den huCD4 und huKorezeptor transgenen Mäusezellen, die frühen Schritte der Infektion statt (Keppler *et al.*, 2001; Keppler *et al.*, 2002). In primäre Makrophagen und Mikrogliazellen, jedoch nicht in Lymphozyten, der transgenen Ratten werden auch infektiöse Viren produziert und in *in vivo* Experimente in den Tieren kann Virusreplikation, allerdings nur auf einem niedrigen Niveau, nachgewiesen werden (Keppler *et al.*, 2002).

huCD4/huCXCR-4 transgene Ratten wurden neben nicht transgenen Mäusen zur Untersuchung der in dieser Arbeit zu testenden Vakzinierungsstrategie verwendet. In erster Linie war es wichtig, dass diese Ratten gegen huCD4 und huCXCR-4 tolerant sind und somit eine Analyse des Serums bezüglich seines antiviralen Neutralisationsvermögens ermöglichen. Im Serum vorhandene Antikörper gegen huCD4 und huCXCR-4 würden in Neutralisationsversuchen an die Rezeptoren der Indikatorzelle binden und somit den Viruseintritt blockieren, was eine Validierung dieser Experimente unmöglich machen würde.

1.9 HIV-1-Vakzinierungsstudien

Seit der Entdeckung des HI-Virus vor über zwanzig Jahren sind zahlreiche verschiedene Vakzinierungsansätze auf ihre Fähigkeit hin untersucht worden, Immunantworten und einen Schutz vor Infektionen zu induzieren. Obwohl gegenwärtig (Stand 2005) über 30 klinische Phase I-III-Studien durchgeführt werden, ist im Moment kein effizientes HIV-Vakzin in Sicht. Im Folgenden wird nun auf die verschiedenen Vakzinierungsansätze eingegangen, wobei zwischen den Vakzinen unterschieden wird, deren Wirksamkeit hauptsächlich auf der Induktion von ZTLs (attenuiertes Virus, DNA, Vektor-Vakzine, siehe 1.9.1) beruht und jenen, die auf der Induktion neutralisierender Antikörper (inaktiviertes Virus, Untereinheiten-Vakzin, VLPs, siehe 1.9.2) basieren.

1.9.1 Induktion einer größtenteils zellulären Immunantwort

1.9.1.1 Attenuiertes Virus

Bei vielen Krankheiten (z.B. Masern, Mumps, Polio) wurden erfolgreiche Vakzine mit replikationsfähigen, aber attenuierten Erregern entwickelt. Sie induzieren eine langanhaltende protektive Immunantwort. Im Makaken/SIV-Modell wurde relativ frühzeitig die Fähigkeit von attenuierten SI-Viren (mit einer Deletion des *nef*-Gens) erkannt, einen Schutz vor einer SIV-Infektion zu induzieren (Daniel *et al.*, 1992; Johnson und Desrosiers, 1998). Weitere Bemühungen betrafen die Generierung attenuierter Viren mit Deletionen in weiteren Genen (*vif* und *vpr*). Es zeigte sich allerdings, dass stark attenuierte Viren als Konsequenz der Abschwächung einen geringeren Schutz vor einer Infektion induzieren (Johnson *et al.*, 1999). Als HIV-Vakzin im Menschen ist die Anwendung attenuierter Viren derzeit noch zu unsicher, da die Entstehung veränderter HIV-Mutanten mit erhöhten Replikationskinetiken nicht völlig ausgeschlossen werden kann (Baba *et al.*, 1995; Berkhout *et al.*, 1999).

1.9.1.2 DNA-Vakzine

DNA-Vakzine beruhen auf bakteriellen Plasmiden, die eine Expressionskassette für ein Fremdgen enthalten. Im Falle von HIV-DNA-Vakzinen handelt es sich häufig um das *gag*-Gen. Diese Vakzine können schnell, günstig und in großen Mengen produziert werden und sind darüber hinaus sehr stabil, was Transport und Aufbewahrung erleichtert. Obwohl HIV-DNA-Vakzine in Mäusen recht effizient spezifische ZTLs induzieren, treten in Affen und vor allem in Menschen Probleme auf. Die Schwierigkeiten bestehen im Erreichen einer effizienten Aufnahme und Expression der DNA, welches Voraussetzungen für die Induktion einer starken Immunantwort sind. Daher kommt es nach Vakzinierungen möglicherweise, trotz zum Teil deutlich niedrigerer Virustiter im Vergleich zu nicht vakzinierten Tieren, zu keiner effizienten Protektion im SIV/Makaken-Modell (Boyer *et al.*, 1996). Aus diesem Grund nutzen aktuelle Strategien hauptsächlich DNA-Vakzine in Kombination mit anderen Vakzinierungsmethoden (virale Vektoren, Proteine).

1.9.1.3 Vektor-Vakzine

HIV-Vektor-Vakzine beruhen auf rekombinanten Viren gründlich charakterisierter und bereits erfolgreich angewendeter Lebendimpfstoffe. Dabei werden vor allem rekombinante Pocken- (z.B. MVA (*modified vaccinia Ankara*)), Adeno-, Polio- und Semliki-Forest-Viren verwendet, die auch für HIV-spezifische Gene kodieren (meist *gag* und *pol*). Auch Bakterien (*Listeria*, *Salmonella*) mit Fremd-DNA kommen als HIV-Vektor-Vakzine zum Einsatz. Im SIV/Makaken-Modell wurde, wie oben bei den DNA-Vakzinen beschrieben, nur selten eine effiziente Protektion festgestellt (Barouch *et al.*, 2001).

Bei Anwendungen im Menschen muss zudem bedacht werden, dass viele Personen bereits spezifische Antikörper gegen verschiedene Vektoren besitzen (z.B. Adenovirus und Vacciniavirus) und somit die Wirksamkeit des Vakzins durch die Neutralisation der Vektoren herabgesetzt werden kann. Diese Immunität stammt von früheren Infektionen oder Vakzinierungen mit demselben Vektor.

1.9.2 Induktion einer größtenteils humoralen Immunantwort

1.9.2.1 Protein- bzw. *Subunit*-Vakzine

Zu den ersten getesteten HIV-Vakzinen überhaupt gehören die Protein- bzw. *subunit*-Vakzine. Sie bestehen aus dem rekombinanten Hüllprotein von HIV in Form von gp160 oder gp120 (Berman *et al.*, 1990; Robey *et al.*, 1986). Die Studien betrafen sowohl Immunisierungen mit monomerem als auch mit oligomerem Env-Protein und später auch mit modifizierten Env-Glykoproteinen. Zu diesen Modifikationen zählen Env-Proteine, die entweder durch einen reduzierten Glykosylierungsgrad (Koch *et al.*, 2003) oder durch Deletionen in den variablen Domänen (V1-V3) neue Epitope exponieren. Das Hauptmanko fast aller dieser früheren und neueren Studien ist, dass trotz einer starken humoralen Immunantwort sowohl in Affen als auch in Menschen keine gruppenübergreifende Neutralisationsfunktion induziert wird. Allein im Menschen wurden bis zum jetzigen Zeitpunkt über 70 Phase I- und Phase II-Studien mit unterschiedlichen *subunit*-Vakzinkandidaten ohne den gewünschten Erfolg getestet (Stand 2005). Die Ergebnisse der beiden einzigen Phase III-Vakzinierungsstudien in Menschen sind ebenfalls enttäuschend: Weder in der ersten Vakzinierungsstudie des Unternehmens VaxGen in Nordamerika mit AIDSVAX B/B, einem bivalenten monomeren gp120-Protein des Stammes B (Cohen, 2003; Cohen und Fox, 2003) noch in der zweiten Vakzinierungsstudie von VaxGen in Thailand mit AIDSVAX B/E, einem bivalenten monomeren gp120-Protein der Stämme B und E, wurde ein Schutz vor einer HIV-Infektion induziert. Derzeit läuft eine weitere Phase III-Studie von VaxGen mit einem veränderten *prime-boost*-Protokoll (McNeil *et al.*, 2004).

1.9.2.2 Inaktiviertes Virus

Die vollständige Inaktivierung von Viren wird durch die Behandlung mit Chemikalien (z.B. aldehydische Agenzien) erreicht. Auf abgetöteten Erregern basieren z.B. die gebräuchlichen Impfstoffe gegen Influenza- oder Hepatitis-A-Viren. Studien mit inaktivierten SI-Viren brachten bisher keine umfassende Protektion von Affen bei *challenge*-Versuchen (Carlson *et al.*, 1990; Lifson *et al.*, 2004) und rückten somit Vakzinierungen von Menschen und Diskussionen über eventuelle Sicherheitsrisiken in den Hintergrund.

Große Aufmerksamkeit wurde einer - scheinbar - protektiven Wirkung gegen SIV in vakzinieren Makaken zuteil. Tiere, die mit Formalin-fixierten SIV-Präparationen immunisiert wurden, waren bei *challenge*-Experimenten geschützt (Murphey-Corb *et al.*, 1989). Die Protektion war besser als bei allen bisher getesteten SIV- oder SHIV-Vakzinen. Es stellte sich jedoch heraus, dass dieser Schutz nur gegen das *challenge*-Virus vorlag, das man in

humanen T-Zellen produziert hatte (Stott, 1991). Makaken dagegen, die mit in Makakenzellen produzierten Viren infiziert wurden, waren ungeschützt. Der Grund bestand darin, dass Viren, die in humanen Zellen produziert wurden, humane MHC-Moleküle inkorporiert hatten, die effiziente Ziele für neutralisierende Antikörper gegen humanes MHC in Makaken darstellten.

1.9.2.3 HIV-VLPs bzw. HIV-PV

Eine Alternative zu inaktivierten Viren sind so genannte virusähnliche Partikel (VLPs, *virus like particles*) oder Pseudovirionen (PV). Dabei handelt es sich um rekombinant hergestellte, nicht infektiöse Partikel mit großer Ähnlichkeit zu echten Virionen. Sie benötigen zum Teil keine intensive Inaktivierung und sind zudem vielfältig manipulierbar.

Im Falle von Retroviren sind ausschließlich die Gag-Proteine notwendig, um VLPs/PV zu bilden. Sie assemblieren dabei selbstständig an der Plasmamembran der Zelle und schnüren sich anschließend als nicht infektiöse Partikel (ohne Env) ab (Gheysen *et al.*, 1989; Wagner *et al.*, 1992). Wenn jedoch das HIV-*env* Gen koexprimiert wird, werden die HIV-Glykoproteine in der Lipidmembran der freigesetzten VLPs/PV in einer nativen Konformation eingebaut. Allerdings kam es, ähnlich zu den Ergebnissen mit inaktivierten Viren, bei Immunisierungsexperimenten mit VLPs/PV nicht immer zu hohen Env-Antikörpertitern, die darüber hinaus auch keinen gruppenübergreifenden Schutz bei *challenge*-Experimenten in Makaken zeigten (Notka *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1998). Derzeit werden, auch in dieser Arbeit, Anstrengungen unternommen, VLPs/PV zu modifizieren und dadurch eine bessere Immunantwort zu induzieren.

1.9.2.4 Exposition von induzierten Env-Epitopen

Die oben beschriebenen Vakzinierungsstrategien führten zur Induktion von Env-Antikörpern, die, wenn überhaupt, nur homologes oder verwandtes Virus neutralisieren. Sie zeigten keine oder eine nur geringe Kreuzneutralisation. Allerdings deutet die Existenz humaner kreuzneutralisierender Antikörper in Patienten (siehe 1.7.4) darauf hin, dass es prinzipiell möglich ist, solche Antikörper durch die Exposition der entsprechenden Epitope zu generieren.

Zurzeit werden mehrere Strategien verfolgt, neue Epitope des Env-Proteins zu exponieren. Man hofft, dass Antikörper gegen diese Epitope eine verstärkte Neutralisation gegen sowohl homologe als auch heterologe Viren zeigen. In diesem Zusammenhang, und dies ist auch die Basis der in dieser Arbeit verfolgten Strategie, wird überprüft, ob Env-Epitope, die ausschließlich während des dynamischen Fusionsprozesses der viralen Membran mit der

Plasmamembran exponiert werden, nützliche Immunogene darstellen. Diese möglicherweise konformationell konservierten Epitope könnten im nativen Env-Molekül unzugänglich sein und nur während des Fusionsprozesses transient exponiert werden. Alternativ wäre es denkbar, dass potentielle Epitope für kreuzneutralisierende Antikörper im nativen Env-Molekül zwar räumlich zugänglich, aber nur schwach immunogen sind. Antikörper, die gegen diese Epitope generiert werden, könnten dann an natives Protein binden und möglicherweise die Kreuzneutralisation verschiedener Viren bewirken. In diesem Zusammenhang wurden bereits Env-CD4 chimärische Proteine (Fouts *et al.*, 2002) und Env-Proteine mit gebundenem löslichem CD4 oder gebundenem Rezeptorkomplex (Xiao *et al.*, 2003) als Immunogene untersucht. Allerdings kam es dabei bisher nicht zu einer Induktion kreuzneutralisierender Antikörper.

Der Ansatz, konservierte induzierte Env-Epitope anzureichern und als Vakzin zu verwenden, ist ebenfalls Grundlage dieser Arbeit. Es ist jedoch denkbar, dass relevante Epitope nur dann exponiert werden, wenn Env-Moleküle korrekt gefaltet und in eine Lipiddoppelschicht eingebettet vorkommen. In VLPs, die wie oben beschrieben leicht zu generieren und zu modifizieren sind, ist dies der Fall. Es wurde beschrieben, dass HI-Virionen die zellulären Rezeptoren CD4 und CXCR-4 oder CCR-5 in ihre Membran inkorporieren können (Endres *et al.*, 1997) und dadurch fähig sind, Env-exprimierende Zellen zu infizieren. Die Pseudotypisierung mit CD4 und CXCR-4 wurde auch für Rabiesviren (Mebatsion *et al.*, 1997), VSV (*vesicular stomatitis virus*) (Schnell *et al.*, 1997) und MoMLV (*moloney murine leukemia virus*) (Somia *et al.*, 2000) beschrieben. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass HIV-PV mit eingebautem HIV-Env-Glykoprotein (Env-PV) fähig sind, mit HIV-PV mit eingebautem CD4 und CXCR-4 (CD4/X4-PV) zu fusionieren. Die resultierenden fusionierten Strukturen sind fähig, Zellen zu infizieren und ein Reportergen zu transduzieren (Sparacio *et al.*, 2000). Mit zahlreichen Kontrollen konnte belegt werden, dass die interretrovirale Membranfusion zwischen Pseudovirionen in extrazellulären Medien ohne eine Beteiligung zellulärer Membranen erfolgen kann, und dass die Luziferasegentransduktion der fusionierten Strukturen unabhängig von Kontaminationen mit Membranvesikeln verläuft (Sparacio *et al.*, 2002). Auch andere Arbeitsgruppen konnten den Vorgang der interretroviralen Membranfusion bestätigen (Zhou und Aiken, 2001). Es ist anzunehmen, dass während der Fusion zwischen Env- und CD4/X4-PV die gleichen transienten Epitope des Env-Proteins exponiert werden wie bei der Infektion einer T-Zelle durch einen HI-Virion.

1.10 Zielsetzung

Keines der bisher getesteten HIV-Vakzine, einschließlich der auf dem HIV-Glykoprotein basierenden (siehe 1.9.2.1), sind zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen primäre HIV-Isolate aus Patienten fähig. Allerdings wurden aus HIV-infizierten Patienten einige wenige Antikörperspezies isoliert, die *in vitro* zur Neutralisation solcher Primärisolate in der Lage sind. Zudem vermittelten diese Antikörper nach einem passiven Transfer in Schimpansen und Makaken und anschließenden *challenge*-Experimenten mit HIV-1 (Conley *et al.*, 1996) oder SHIV (Baba *et al.*, 2000; Mascola *et al.*, 1999; Mascola *et al.*, 2000) *in vivo* eine Protektion der Tiere oder einen niedrigeren Virustiter in den Tieren.

Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluation einer Vakzinierungsstrategie, deren Absicht die Induktion einer neutralisierenden oder gegebenenfalls kreuzneutralisierenden humoralen Immunantwort gegen HIV-1 ist. Die Strategie basiert darauf, konservierte konformationelle Epitope des Env-Glykoproteins während dessen dynamischen Interaktion mit seinem zellulären Rezeptor-Komplex zu exponieren und anzureichern. Zur Charakterisierung und Optimierung der dabei miteinander interagierenden Komponenten werden Untersuchungen zur Proteinzusammensetzung und -herstellung von Pseudovirionen durchgeführt. Nicht infektiöse HIV-PV mit eingebautem HIV-Env werden mit nicht infektiösen HIV-PV mit eingebautem HIV-Rezeptor-Komplex (humanes CD4 und humanes CXCR-4) gemischt. Um die normalerweise nur transient exponierten, intermediären Konformationen des HIV-Env-Moleküls für ein Vakzin zu nutzen, müssen diese Konformationen chemisch oder genetisch fixiert werden. Die fixierten Pseudovirionen werden nun als Immunogene zur Untersuchung der induzierten humoralen Immunantwort in nicht transgenen Mäusen und huCD4 und huCXCR-4 transgenen Ratten analysiert.

Die gewonnen Erkenntnisse sollen einerseits einen Beitrag zur Aufklärung der Eigenschaften von Pseudovirionen liefern und andererseits durch die Evaluation einer neuen Vakzinierungsstrategie möglicherweise für die Entwicklung eines effektiven HIV-1-Vakzins für Menschen von Nutzen sein.

2 MATERIAL

2.1 Antikörper

Die entsprechenden Verdünnungen der Antikörper in den Nachweisverfahren Immunfluoreszenz (IF), Western Blot (WB), ELISA, Partikelimmunfluoreszenz (PIF), Fusionskinetik (FK) und Virusneutralisation (VN) sind jeweils angegeben.

2.1.1 Primärantikörper

Mab183 (IF, WB und PIF unverdünnt, ELISA unverdünnt - 1:5x10 ⁷)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen HIV-1 CA, Hybridomüberstand, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (Chesebro <i>et al.</i> , 1992).
Chessie 8 (IF und PIF unverdünnt)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen die C-terminale Domäne von gp41, Hybridomüberstand, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (Abacioglu <i>et al.</i> , 1994).
H902 (IF und PIF unverdünnt, ELISA unverdünnt - 1:5x10 ⁷ , VN unverdünnt - 1:1000)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen die V3-Domäne von gp120, Hybridomüberstand, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (Chesebro und Wehrly, 1988).
rb α-gp120 (WB 1:2500, PIF 1:100)	Polyklonaler Antikörper gegen rekombinantes gp120 (des Stamms IIIB) aus Kaninchen, hergestellt 1990 in der Arbeitsgruppe Bosch, (Bosch und Pawlita, 1990).
4G10 (VN unverdünnt - 1:1000)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen die V3-Domäne von gp120, Hybridomüberstand, erhalten von A. von Brunn, München, (von Brunn <i>et al.</i> , 1993).

b12 (VN 10 - 0,01 µg/ml)	Humaner monoklonaler kreuzneutralisierender Antikörper gegen ein Epitop, das mit der CD4-Bindungsstelle überlappt, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (Burton <i>et al.</i> , 1994).
2G12 (VN 10 - 0,01 µg/ml)	Humaner monoklonaler kreuzneutralisierender Antikörper gegen ein Mannose-assoziiertes Epitop des gp120-Proteins, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (Trkola <i>et al.</i> , 1996b).
2F5 (ELISA 10 - 5x10 ⁶ µg/ml, VN 10 - 0,01 µg/ml)	Humaner monoklonaler Antikörper gegen die Ektodomäne von gp41, kreuzneutralisierend, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (Conley <i>et al.</i> , 1994).
CG10 (VN 10 - 0,01 µg/ml)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen ein CD4-induziertes Epitop von gp120, Hybridomüberstand, erhalten von J. Gershoni, Tel Aviv, Israel, (Finnegan <i>et al.</i> , 2001).
Sim2/Sim4 (FK 1:10 und VN unverdünnt - 1:1000)	Gemisch muriner monoklonaler Antikörper gegen humanes CD4, Hybridomüberstände, bezogen über das <i>NIH AIDS Research and Reference Reagent Program</i> , (McCallus <i>et al.</i> , 1992).
rb α-CD4 (HD) (WB 1:2000)	Polyklonaler Antikörper gegen CD4 aus Kaninchen, hergestellt 1995 in Heidelberg.
α-EGFR (ELISA unverdünnt - 5x10 ⁷ , PIF unverdünnt, VN 1 - 1:1000)	Muriner monoklonaler Antikörper gegen ein extrazelluläres Epitop des humanen EGFR, Hybridomüberstand, erhalten von K. Khazaie, Boston, USA, (Waterfield <i>et al.</i> , 1982).

2.1.2 Sekundärantikörper

gt- α -mo ALEXA⁵⁹⁴ (IF 1:200, PIF 1:100), *Molecular Probes* (Eugene, USA)

gt- α -mo ALEXA⁴⁸⁸ (IF 1:200, PIF 1:100), *Molecular Probes* (Eugene, USA)

gt- α -rb ALEXA⁵⁹⁴ (PIF 1:100), *Molecular Probes* (Eugene, USA)

gt- α -mo POX (WB 1:10000, ELISA 1:8000), *Dianova* (Hamburg)

gt- α -rb POX (WB 1:10000, ELISA 1:8000), *Dianova* (Hamburg)

gt- α -hu POX (ELISA 1:8000), *Sigma-Aldrich* (Steinheim)

gt- α -rat POX (ELISA 1:8000, WB 1:10000), *Sigma-Aldrich* (Steinheim)

2.2 Bakterien

E. coli HB101

Genotyp: F⁻, *hsd* S20 (r_B⁻m_B⁻), *thi*-1, *sup*E44, *ara*14, *gal*K2, *lac*Y1, *pro*A2, *rps*L20, (Str^R), *xyl*-5, *mtl*-1, *rec*A13, *mcr*B, *leu*B6, *Invitrogen* (Groningen, Niederlande).

2.3 Eukaryotische Zelllinien

2.3.1 Adhärenzte Zellen

293T Humane embryonale Nierenepithelzelllinie, Zellen exprimieren stabil das SV40-T-Antigen, (Pear *et al.*, 1993).

TZM-bl Humane HeLa-Derivate, die stabil CD4, CXCR-4 und CCR5 exprimieren und stabile Integrate des β -Galaktosidase- und des Luziferasegens unter der Kontrolle des HIV-LTRs besitzen (Derdeyn *et al.*, 2000; Platt *et al.*, 1998).

2.3.2 Suspensionszellen

SP2/0 Myelomzellen einer BALB/C-Maus, die keine Antikörper sezernieren (Klon: P3x63Ag8.SP2/0). HAT-sensitiv, geeignet zur Fusion mit syngeneten Milzzellen (ATCC Nummer: CRL-1646), (Shulman *et al.*, 1978).

- | | |
|------------------------------|---|
| gp41 HXB-2 ^{Hefe} | gp41-Protein, Stamm HXB-2, produziert in Hefe, bezogen über <i>Viral Therapeutics</i> (New York, USA). |
| gp120 IIIB ^{CHO} | gp120-Protein, Stamm IIIB, produziert in CHO-Zellen, bezogen über <i>Immune Diagnostics</i> (Woburn, USA). |
| gp120 LAI ^{CHO} | gp120-Protein, Stamm LAI, produziert in CHO-Zellen, bezogen über <i>Perkin Elmer</i> (Boston, USA). |
| gp120 SF ^{CHO} | gp120-Protein, Stamm SF, produziert in CHO-Zellen, bezogen über das <i>NIBSC Centralised Facility for AIDS Reagents</i> . |
| gp120 IIIB ^{Baculo} | gp120-Protein, Stamm IIIB, produziert in Insektenzellen, bezogen über <i>Immune Diagnostics</i> (Woburn, USA). |

2.7 Nukleinsäuren

2.7.1 Plasmide

Plasmide, deren Expression im **L2/S2-Bereich** stattfindet:

Bezeichnung	Nr.	Quelle / Referenz	Beschreibung
pBluescriptM13+	76	<i>Stratagene</i> , La Jolla, USA	Klonierungsplasmid, T7- und T3-Promotor.
pβAk-Env^{WT}	102	(Kräusslich <i>et al.</i> , 1993)	Expressionsplasmid für HIV-1-Env (BH10), Tat, Rev und Vpu, Neomycinresistenz, β -Aktin-Promotor.
pCMV-CD4	253	Erhalten von B. Schnierle, Frankfurt, 1994 (Krüger <i>et al.</i> , 1996)	Expressionsplasmid für huCD4, CMV-Promotor.
pKexHIVΔEnv	306	Bosch 1995	Expressionsplasmid für subvirale HIV-1-Partikel, Leserahmenverschiebung in <i>env</i> führt nach 30 AS zur Synthese eines defekten Env-Proteins, CMV-Promotor.
pβAk-Env^{Fus-}	328	Bosch 1996 (Freed <i>et al.</i> , 1990)	Expressionsplasmid für HIV-1-Env (BH10) Fus- (V \rightarrow E Mutation an AS-Position 2 des FP, Env-Position 513), Tat, Rev und Vpu, β -Aktin-Promotor.
pKex-EGFR-TR	376	Bosch 1999 (Henriksson <i>et al.</i> , 1999)	Expressionsplasmid für verkürzten huEGFR (7 statt 542 zytoplasmatische AS), CMV-Promotor.

pNL4-3-LuziΔRΔEnv	402	(He <i>et al.</i> , 1995)	Proviralet HIV-1 Klon, Env durch Auffüllen einer <i>NdeI</i> Schnittstelle inaktiviert, an der Stelle von <i>nef</i> befindet sich das <i>Firefly</i> -Luziferasegen, <i>vpr</i> durch Insertion inaktiviert.
pc-CCR5	405	(Deng <i>et al.</i> , 1996)	Expressionsplasmid für CCR5, CMV-Promotor.
pHITamph.MuLV-Env	435	(Soneoka <i>et al.</i> , 1995)	Expressionsplasmid für amphotropes MuLV-Env, CMV-Promotor.
pNL4-3-$\Delta\Psi\Delta$Env	475	Bosch 1998	Proviralet HIV-1 Klon, Mutation 33 AS stromabwärts des Env (BH10)-Leserahmens, Deletion von 37 bp des Verpackungssignals Ψ .
pMD.G	557	Erhalten von R. Zufferey, Genf, Schweiz, (Naldini <i>et al.</i> , 1996)	Expressionsplasmid für VSV-G, CMV-Promotor.
prev-IRES-tat	583	Bosch 1999	Expressionsplasmid für Tat unter der Kontrolle des pIND-Promotors und Rev unter der Kontrolle einer IRES-Sequenz.
pGRE-MEnv	597	Erhalten von K. Conzelmann, München, 1999	Dexamethason-induzierbares Expressionsplasmid für HIV-1-Env (AD8).
pUbC-CXCR-4ΔCT	609	(Signoret <i>et al.</i> , 1997)	Expressionsplasmid für huCXCR-4 (Fusin) (ohne 42 AA am C- terminalen Ende von CXCR-4), Ubiquitin-Promotor.

pcDNAIIIW61Drev-env	688	Erhalten von N. Almond, South Mimms, UK, (Groenink <i>et al.</i> , 1992)	Expressionsplasmid für HIV-1, Rev/Env (W61D), Primärisolat (wenige Passagen), CMV-Promotor.
pCMV89.6P	732	Erhalten von R. Wagner, Regensburg, 2002	Expressionsplasmid für kodon-optimiertes 89.6P-HIV-1-Env, CMV-Promotor.
pSPEpoDEXAmEnv	758	Bosch, 2002	Dexamethason-induzierbares Expressionskonstrukt für HIV-1-Env (Ad8) mit heterologem Signalpeptid (Erythropoetin).
pSPtPADEXAmEnv	759	Bosch, 2002 (Binley <i>et al.</i> , 2000)	Dexamethason-induzierbares Expressionskonstrukt für HIV-1-Env (Ad8) mit heterologem Signalpeptid (<i>tissue plasminogen activator</i>).
pcDNA-X4-IRES-CD4	792	Bosch, 2003	Expressionsplasmid für CXCR-4 (unter der Kontrolle eines CMV-Promotors) und IRES-CD4.
pcDNA-HIVΔEnv	808	Erhalten von B. Müller, Heidelberg, 2003	Expressionsplasmid für subvirale HIV-1-Partikel (<i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>rev</i> , <i>tat</i>), CMV-Promotor.

Plasmide, deren Expression im **L3/S3-Bereich** stattfindet:

Bezeichnung	Nr.	Quelle / Referenz	Beschreibung
pNL4-3^{BH10}	27	(Bosch und Pawlita, 1990)	Proviralet Wt-HIV-1-Klon (pNL4-3 ^{BH10}), Chimäre aus pNL4-3 und BH10-Env.

2.7.2 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit benötigten Oligonukleotide wurden in der Abteilung „Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung“ des DKFZ, Heidelberg synthetisiert. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten zwei Oligonukleotide sind in 6.2 zu finden.

2.8 Viren

- pNL4-3^{VSVG} VSV-G pseudotypisiertes pNL4-3ΔEnv-Virus, produziert in 293T-Zellen, erhalten von O. Keppler, Heidelberg, 2005.
- pNL4-3^{WT} T-tropes HIV-1-Laborisolat, produziert in MT4-Zellen, (Bosch und Pawlita, 1990).
- J27 T-tropes HIV-1-Primärisolat, produziert in MT4-Zellen, erhalten von O. Keppler, Heidelberg, 2005, (Scarlatti *et al.*, 1997).
- J130 T-tropes HIV-1-Primärisolat, produziert in MT4-Zellen, erhalten von O. Keppler, Heidelberg, 2005, (Scarlatti *et al.*, 1997).
- UG021 T-tropes HIV-1-Primärisolat, produziert in MT4-Zellen, erhalten von O. Keppler, Heidelberg, 2005, (Gao *et al.*, 1996).
- BaL M-tropes HIV-1-Laborisolat, produziert in PM-1-Zellen, erhalten von O. Keppler, Heidelberg, 2005.
- JRC5F M-tropes HIV-1-Primärisolat, produziert in PBMCs, erhalten von M. Dittmar, Heidelberg, 2005 (Cann *et al.*, 1990).
- Ad8 M-tropes HIV-1-Laborisolat, produziert in 293T-Zellen, erhalten von V. Bosch, 2005.
- YU-2 M-tropes HIV-1-Primärisolat, produziert in 293T-Zellen, erhalten von O. Keppler, Heidelberg, 2005 (Li *et al.*, 1991).

2.9 Kits

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
QIAGEN Plasmid Giga Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	<i>Qiagen</i> (Hilden)
Innotest™ HIV Antigen mAb	<i>Innogenetics</i> (Gent, Belgien)
<i>Luciferase Assay System</i>	<i>Promega</i> (Madison, USA)

2.10 Größenstandards

λ -DNA-Marker (<i>Hind</i> III-verdaut):	<i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Roth)
<i>Low Range</i> SDS-PAGE-Marker:	<i>Bio-Rad</i> (Hercules, USA)

Protein	MG (kDa)
Phosphorylase B	113,0
Rinder-Serumalbumin	92,0
Ovalbumin	52,3
Carboanhydrase	35,3
Sojabohnen-Trypsininhibitor	28,7
Lysozym	21,3

2.11 Chemikalien und Reagenzien

An dieser Stelle wird darauf verzichtet, sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und Reagenzien einzeln aufzulisten. Alle verwendeten Chemikalien werden unter dem Punkt *Puffer und Lösungen* (siehe 2.12) oder in den Kapiteln 3 und 4 erwähnt und wurden üblicherweise von folgenden Firmen bezogen: *Merck* (Darmstadt), *Roth* (Karlsruhe), *AppliChem* (Darmstadt), *Fluka* (Buchs, Schweiz), *Sigma-Aldrich* (Steinheim) und *Gibco* (Karlsruhe). Einige Reagenzien und ihre Bezugsquellen sind im Folgenden aufgelistet:

DAPI	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
Freunds Adjuvans, komplett und inkomplett	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
Glycerin	<i>AppliChem</i> (Darmstadt)
Isofluran	<i>Baxter Mediat</i> (München)
Ketamin	<i>Essex Tierarznei</i> (München)
Protein-G-Sepharose-beads <i>gammabind</i> G Typ 3	<i>Amersham</i> (Uppsala, Schweden)
Polybren	<i>Sigma-Aldrich</i> (Steinheim)
Rompun	<i>Bayer</i> (Leverkusen)

2.12 Puffer und Lösungen

Agarose-Gelelektrophorese

50 x EP-Puffer :	2 M Tris/HCl, pH 7.5 250 mM Natriumacetat 50 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 7.8 einstellen
EtBr-Lösung:	2 µg EtBr/ml
Farbmarker:	6 x <i>loading dye</i> , <i>MBI Fermentas</i> (St. Leon-Roth)

DNA-Minipräparation

Sol A:	50 mM Glukose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl, pH 8.0
Sol B:	0,2 M NaOH 1% SDS
Sol C :	3 M Natriumacetat, pH 4.8

gp120-, gp41-, CA- und BSA-Antikörper-ELISA

Casein-Blockpuffer :	0,2% Casein 0,05% Tween in PBS
Waschpuffer :	0,05% Tween in PBS
ELISA-Puffer:	100 mM Natriumacetat pH mit Essigsäure auf 6.0 einstellen
TMB-Puffer:	10 mg/ml TMB in DMSO
TMB-Substrat :	10 ml ELISA-Substrat 100 µl TMB-Puffer 1 µl H ₂ O ₂
Stopp-Puffer:	1M H ₂ SO ₄

Kalzium-Phosphat-Transfektion

2 x HBS-Puffer: 50 mM HEPES, pH 7.2
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
auf pH 7.13 einstellen
steril filtrieren (Ø 0,2 µm)

CaCl₂-Lösung: 2,5 M

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Lösung A_{Kornberg}: 30% Acrylamid
0,15% Bisacrylamid

Lösung A_{Laemmli}: 30% Acrylamid
0,8% Bisacrylamid

Lösung B: 1,5 M Tris/HCl, pH 8.8
0,4% SDS

Lösung C: 0,75 M Tris/HCl, pH 6.8
0,4% SDS

2 x SB
(*sample buffer*): 0,125 M Tris/HCl, pH 6.8
4% SDS
10% β-Mercaptoethanol
10% Glycerol
0,002% Bromphenolblau

5 x Laufpuffer (LP): 60 g Tris
285 g Glycin
10 g SDS
ad 2000 ml VE-H₂O

Coomassie-Blau-Färbung

Coomassie-Blau-Färbelösung I:	GelCode Blue Stain Reagent (<i>Pierce Perbio</i> , Bonn)
Coomassie-Blau-Färbelösung II:	0,6 g/l Coomassie brilliant blue R250 (<i>Serva</i> , Heidelberg) 50% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Blau-Entfärbelösung:	7,5% Essigsäure 5% Methanol

Western-Blot-Analyse

Boratpuffer:	20 mM Borsäure 1 mM EDTA 0,1 mM DTT pH 8.8
Lösung 1 (Blockierlösung):	10% BSA, 10% Tween-20 in PBS
Lösung 2 (Waschlösung):	1% BSA, 1% Tween-20 in PBS
Primärantikörperlösung:	Primärantikörper verdünnt in Lösung 2
Sekundärantikörperlösung:	Sekundärantikörper verdünnt in Lösung 2
ECL-Lösung:	<i>Amersham</i> (Uppsala, Schweden)

X-Gal-Assay

Fixierlösung:	1% Formaldehyd 0,2% Glutaraldehyd in PBS
X-Gal-Lösung:	1 mg/ml X-Gal in DMSO 4 mM $K_3Fe(CN)_6$ 4 mM $K_4Fe(CN)_6$ in PBS

Herstellung monoklonaler Antikörper

HAT-Medium:	15% FCS (<i>Gibco BRL</i> , Karlsruhe) 240 μ M Mercaptoethanol (0,1 M Stammlösung zuvor steril filtrieren) 10 ml 50 x HAT-Mediumzusatz (<i>Sigma</i> , Deisenhofen) Penicillin/Streptomycin 1% (<i>Gibco BRL</i> , Karlsruhe) in 500 ml RPMI-Medium
Waschmedium:	RPMI-Medium
PEG:	50%ige Polyethylenglykollösung (PEG), PEG 1500 (<i>Sigma</i> , Deisenhofen)

Protein G-Affinitätsaufreinigung

Protein G:	Protein-G-Sepharose-beads <i>gammabind</i> G Typ 3 (<i>Amersham</i> , Uppsala, Schweden)
Elutionspuffer:	0,1 M Glycin in PBS, pH 3.0
TRIS-Puffer:	1 M TRIS-HCl, pH 8.0
Waschpuffer:	1 M Essigsäure, pH 2.5

Weitere

EDTA:	0,5 M pH auf 8.0 einstellen
Elvanol:	20 g Moviol 4-88 (<i>Calbiochem</i> , Bad Soden) 80 ml PBS 20 ml Glycerol
TE:	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA
PBS:	8 g/l NaCl 0,2 g/l KCl 1,44 g/l Na ₂ HPO ₄ 0,25 g/l K ₂ HPO ₄ pH auf 7.4 einstellen
Boratpuffer:	20 mM Borsäure 1 mM EDTA 0,1 mM DTT pH auf 8.8 einstellen

2.13 Bakterien- und Zellkulturmedien und -zusätze**2.13.1 Bakterienkultur**

Luria-Broth-Medium (LB):	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH auf 7.5 einstellen, autoklavieren
Ampicillin:	Einsatz 100 µg/ml, <i>Roche</i> (Mannheim)

2.13.2 Zellkultur

DMEM und RPMI-Medium:	<i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
DMEM ^k und RPMI ^k -Medium:	DMEM und RPMI-Medium komplettiert mit FCS und PS (siehe unten)
Fetales Kälberserum (FCS):	Einsatz: 10%, <i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
Penicillin-Streptomycin (PS)-Lösung:	Einsatz 1%, <i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin):	<i>Gibco BRL</i> (Karlsruhe)
Einfriermedium:	70% DMEM bzw. RPMI-Medium 20% FCS 10% DMSO
Serumfreie Medien:	
<i>Keratinocyte Growth Medium</i> , KGM:	<i>Promo Cell</i> (Heidelberg)
<i>Epithelial Cell Growth Medium</i> , EGM:	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)
<i>293-Serum Free Medium</i> , SFM:	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)

2.14 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern, *Renner* (Darmstadt)
Agarosegelkamera, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Brutschrank, *Forma Scientific* (Marietta, USA)
Easy Image Gel-Dokumentationssystem, *Herolab* (Wiesloch)
Eismaschine AF-3, *Scotsman* (Glasgow, England)
Entwicklerrmaschine Classic E.O.S., *Agfa* (Leverkusen)
Feinwaage 2002MP1 *Sartorius* (Göttingen)
Filmkassetten X-OmatTM, *Kodak* (Stuttgart)
Fluoreszenzmikroskop, *Leitz* (Wetzlar)
Gefrierschrank, *Liebherr* (Heidelberg)
Kühltischzentrifuge 5417.R, *Eppendorf* (Hamburg)
Magnetrührer, *Ika Labortechnik* (Staufen)

Mikroskop CKS, *Olympus* (Heidelberg)
Minifuge RF, *Heraeus* (Osterode)
Neubauer Zählkammer, *Neolab* (Heidelberg)
pH-Meter CG822, *Schott* (Mainz)
Pipetten, *Gilson Abimed* (Langenfeld)
Pipettierhilfe (*Pipetboy*), *IBS Integra* (Fernwald)
Rotoren GSA und F28/50, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Rotor SW28, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Rotor SW41Ti, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Schüttler Rockomat, *Tecnomara* (Göttingen)
SDS-PAGE-Apparatur, *Bio-Rad* (Hercules, USA)
Spektralphotometer, *Hitachi* (Tokio, Japan)
Sterilbank, *Baker* (Stanford, USA)
Stromquelle, *Biotec Fischer* (Heidelberg)
Überkopfschüttler, *Heidolph* (Rust)
Ultrazentrifuge, *Beckmann* (Palo Alto, USA)
Vortex (Vibrationsmischer), *Bender und Hobein* (Zürich, Schweiz)
Western Blot-Apparatur, *Bio-Rad* (Hercules, USA)
Zentrifuge RC5C, *Sorvall Du Pont* (Wilmington, USA)

2.15 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen, *Langenbrinck* (Emmendingen)
Dialyseschlauch, *Karl Roth* (Karlsruhe)
ECL-Filme Hyperfilm™, *Amersham* (Uppsala, Schweden)
Econo-Glassäulen, *Bio-Rad* (Hercules, USA)
3 x 5 cm Edelstahlnetze (0,5 mm Maschenweite), *DKFZ* (Heidelberg)
Einweghandschuhe Gentle Skin™, *Meditrade* (Kiefersfelden)
Einwegpipetten, *Falcon* (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA)
Einwegpipettenspitzen, *Greiner* (Frickenhausen)
Einwegskalpelle, *PFM* (Köln)
Einwegspritzen, *Terumo* (Löwen, Belgien)
96well-ELISA-Platte, *Nunc* (Roskilde, Dänemark)
Gel Drying-Folie, *Promega* (Madison, USA)
Glaskapillare, *WU* (Mainz)
Eppendorf-Reaktionsgefäße, *Eppendorf* (Hamburg)
Immobilon-Membran, *Millipore* (Bedford, USA)

Kanülen 0,30 x 13 mm (30G), 0,40 x 21 mm (27G), 0,60 x 25mm (23G), *BD Microlance*
(Huesca, Spanien)

Kryoröhrchen, *Nalgene* (Rochester, USA)

Objektträger, *Langenbrinck* (Emmendingen)

PCR-Reaktionsgefäße, *Eppendorf* (Hamburg)

PS-96well-microplate, *Greiner* (Frickenhausen)

1ml-Spritzen, *B/Braun* (Melsungen)

Sterilfilter (Ø 0,2 µm und 0,45 µm), *Renner* (Darmstadt)

Ultrafiltrationsfiltereinheit (*Vivaflow 200*), *Vivascience* (Hannover)

Ultrafiltrationsröhrchen (*Vivaspin*) 20 ml, *Vivascience* (Hannover)

Ultrazentrifugationsröhrchen, *Beckmann* (Palo Alto, USA)

Whatman*-Papier 3 MM, *Schleicher & Schuell (Dassel)

Zell-Factory*, *cell-stack*, *Corning lifescience (Acton-Massachusetts, USA)

Zellkulturflaschen, *Nunc* (Roskilde, Dänemark)

96well-Zellkulturplatten, *Corning Inc.* (Corning, USA)

Zellkulturschalen, *Sarstedt* (Nürnberg)

Zentrifugationsröhrchen (PP und PS, 15 und 50 ml), *Greiner* (Frickenhausen)

3 METHODEN

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Lagerung und Kultur von Bakterien

Bei den Bakterien, die transformiert werden sollen, handelt es sich um *Escherichia coli* (*E. coli*) vom Stamm HB101. Die Anzucht der Bakterien erfolgt bei einer Temperatur von 37°C entweder in Luria-Broth (LB)-Flüssigmedium (siehe 2.13.1) unter Schütteln oder auf LB-Agarplatten. Die Medien werden mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt, da alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide das entsprechende Resistenzgen (Amp^r, β-Lactamase) tragen.

Flüssigkulturen werden mit einer geeigneten Menge an LB-Medium und dem jeweiligen Selektionsantibiotikum in einem entsprechend großen Reagenzglas oder Erlenmeyerkolben angesetzt, wobei darauf zu achten ist, dass mindestens 80% des Gefäßvolumens Luftraum ist. Das Animpfen des Nährmediums erfolgt mit einem sterilen Zahnstocher, mit dem eine geeignete Kolonie von einer Platte gepickt und dem Medium zugeführt wird.

Bei Plattenkulturen werden die Bakterien mit einer Impföse oder einem Drigalski-Spatel auf einer LB-Agarplatte, welche die geeignete Selektionsdroge enthält, ausgestrichen, so dass Einzelkolonien erhalten werden.

Die Lagerung der Bakterien erfolgt für wenige Tage (Flüssigkultur) bzw. bis zu einem Monat (Plattenkultur) bei 4°C. Für eine längerfristige Lagerung werden von der Flüssigkultur Glycerolkulturen angelegt, die bei -70°C gelagert werden können. Dazu wird 1 ml einer Übernachtskultur mit 0,5 ml steril filtriertem Glycerin versehen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

3.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Plasmid-DNA kann durch Hitzeschock in Bakterien eingebracht werden. Die Bakterien müssen dafür erst kompetent gemacht werden. Dabei werden 5 ml LB/Amp-Medium mit einer Kolonie des gewünschten Bakterienstammes (hier: *E. coli* vom Stamm HB101) angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wird zu 500 ml LB/Amp-Medium gegeben, worauf eine erneute Kultivierung bei 37°C unter ständigem Schütteln bis zu einer OD 595 nm von 0,5 erfolgt (exponentielles Wachstum). Nach Abkühlung der Kultur in einem Eis-NaCl-Gemisch auf 0°C werden die Bakterien in einem GSA-Rotor für fünf Minuten bei 8.000 rpm und 0°C abzentrifugiert. Die sedimentierten

Bakterien werden anschließend in 125 ml eiskaltem CaCl_2 (0,1 M) resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis gehalten. Nach einer erneuten Zentrifugation unter den oben beschriebenen Bedingungen wird das erhaltene Bakteriensediment in einem Gemisch aus 21,5 ml CaCl_2 (0,1 M) und 3,5 ml 86%igem Glycerin aufgenommen. Nicht direkt benötigte Zellen werden in 500 μl -Aliquots in Kryoröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -70°C .

3.1.3 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Ein 100 μl -Aliquot kompetenter *E. coli*, HB101 Bakterien, wird auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA oder 10 μl eines Ligationsansatzes versetzt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt ein Hitzeschock für zwei Minuten bei 42°C , bei dem die Plasmide von den Bakterien aufgenommen werden. Es folgt eine weitere Inkubation des Transformationsansatzes für fünf Minuten auf Eis. Nach Zugabe von 0,8 ml LB-Medium ohne Ampicillin folgt eine Inkubation im Wasserbad für 20 Minuten bei 37°C . Anschließend werden die Bakterien mit einer Tischzentrifuge bei 1.500 rpm für zwei Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird bis auf einen Rest von ca. 200 μl dekantiert, in welchem das Bakteriensediment resuspendiert und auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen wird, die die entsprechende Selektionsdroge enthält. Die Platte wird über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.4 Kryokonservierung und Rekultivierung von Bakterien

1 ml einer von einer Einzelkultur abgeleiteten *E. coli*-Suspension wird mit 300 μl einer 87%igen Glycerinlösung versetzt und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterien findet bei -70°C statt. Für die Rekultivierung der Bakterien werden einige Kristalle der gefrorenen Bakteriensuspension-Glycerin-Gemischs in ein LB/Amp-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmid-DNA-Minipräparation

Puffer und Lösungen:

Sol A: 50 mM Glukose
 10 mM EDTA
 25 mM Tris/HCl, pH 8.0

Sol B: 0,2 M NaOH
 1% SDS
Sol C : 3 M Natriumacetat, pH 4.8

Bei der Plasmid-DNA-Minipräparation können geringe Mengen an Plasmid-DNA aus zuvor transformierten Bakterien (siehe 3.1.3) gewonnen werden. Die erhaltenen Mengen reichen zur Analyse im Restriktionsverdau und zur Transformation von Bakterien aus. Werden dagegen größere Mengen an DNA für experimentelle Zwecke benötigt, kommt die DNA-Maxi- oder Gigapräparation zum Einsatz (siehe 3.2.2 oder 3.2.3).

3 ml LB/Amp-Flüssigmedium werden mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur werden in ein Eppendorfröhrchen überführt und in einer Tischzentrifuge für zwei Minuten bei 8.000 rpm zentrifugiert. Nach vollständigem Dekantieren des Überstands werden die sedimentierten Bakterien in 100 µl Sol A resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt mit 200 µl Sol B nach vorsichtigem Mischen und einer anschließenden Inkubationszeit von genau fünf Minuten auf Eis. Dann werden 150 µl Sol C zugegeben, und der Ansatz wird erneut für mindestens fünf Minuten auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform (1:1) wird das Gemisch leicht geschüttelt. Durch die anschließende Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für zehn Minuten bei 13.000 rpm werden die wässrige und die organische Phase voneinander getrennt. Die nukleinsäurehaltige wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen, mit 1 ml eiskaltem 100%igem Ethanol versetzt, geschüttelt und für mindestens 20 Minuten bei -20°C gelagert.

Im Anschluss an die Ethanolfällung der DNA (siehe 3.2.4.2) wird das getrocknete DNA-Sediment in 50 µl TE-Puffer aufgenommen, wovon 2 µl für die Größenanalyse des Plasmids auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen werden (siehe 3.2.8).

3.2.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation

Um größere Mengen (ca. 500 µg) eines gewünschten Plasmids zu erhalten, werden 200 ml LB-Flüssigmedium mit 2 ml Übernachtskultur angeimpft und über Nacht unter ständigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA wird mit dem „QIAGEN Plasmid Maxi“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) durchgeführt und verläuft nach dem Protokoll und mit den mitgelieferten Lösungen des Herstellers.

3.2.3 Plasmid-DNA-Gigapräparation

Um sehr große Mengen (bis 8 mg) eines gewünschten Plasmids aus transformierten Bakterien für Transfektionen in *Zell-Factories* zu erhalten, werden 2,5 Liter LB/Amp-Flüssigmedium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Diese Großkultur wird über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Die anschließende Extraktion und Aufreinigung der Plasmid-DNA wird mit dem „QIAfilter Plasmid Giga“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) durchgeführt und verläuft nach dem Protokoll und mit den mitgelieferten Lösungen des Herstellers.

3.2.4 Aufreinigung von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Mit einem Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) können Verunreinigungen durch Proteine oder Lipide aus DNA-Lösungen entfernt werden. Dazu wird der zu behandelnde Ansatz mit dem gleichem Volumen an Phenol/Chloroform versetzt, geschüttelt und anschließend in einer Tischzentrifuge für zehn Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Hierbei wird die organische von der wässrigen Phase getrennt. Letztere enthält die Nukleinsäure und kann vorsichtig mit einer Pipette von der organischen Phase abgenommen werden. Zur Erhöhung der Nukleinsäureausbeute kann die organische Phase mit der gleichen Menge TE-Puffer (siehe 2.12) versetzt, geschüttelt und unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert werden, worauf anschließend die beiden wässrigen Phasen vereint werden. Die DNA wird aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt (siehe 3.2.4.2).

3.2.4.2 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Die zu fällende DNA-Lösung wird mit dem 3fachen Volumen 100%igem Ethanol und dem 0,1fachen Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4.8) versetzt und dann für mindestens 20 Minuten bei -20°C gefällt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation des Ansatzes bei 0°C für 15 Minuten bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die sedimentierte DNA mit 70%igem kalten Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach Trocknung des Sediments an der Luft wird die Nukleinsäure in einem TE-Puffer oder in Wasser entsprechenden Volumens (meist 100-200 µl) aufgenommen.

3.2.5 Messung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentration und die Reinheit einer wässrigen Nukleinsäurelösung kann durch eine photometrische Messung der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm ermittelt werden. Dazu wird eine geeignete Verdünnung der DNA-Lösung in H₂O hergestellt und 1 ml dieser Verdünnung in einer Quarzküvette im Photometer vermessen. Als Referenz dient die OD von Wasser. Eine OD bei 260 nm von 1 entspricht einer Doppelstrang-DNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. einer Einzelstrang-DNA-Konzentration von 33 µg/ml.

Um einen Anhaltspunkt über die Reinheit der DNA-Lösung zu erhalten, wird der Quotient aus OD 260 nm und OD 280 nm (Verunreinigungen mit aromatischen Aminosäuren) bestimmt. Liegt dieser Wert zwischen 1,7 und 2,0, so gilt die DNA als ausreichend proteinfrei, ein Wert unter 1,7 ist ein Indiz für eine Kontamination mit Proteinen und ein Wert von über 2,0 kann auf Rückstände von Phenol zurückgeführt werden.

3.2.6 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische Nukleotidsequenzen und spalten DNA-Moleküle an diesen Stellen. Diese bakteriellen Enzyme werden zur Abwehr fremder DNA von Organismen, zum Beispiel von Bakteriophagen, verwendet. Die eigene DNA wird durch Methylierung von einzelnen Basen vor der Spaltung geschützt und dient zur Unterscheidung zwischen eigener und fremder Nukleinsäure. Durch einen Restriktionsschnitt können drei verschiedene Arten von Strangenden erzeugt werden: Bei versetzten Schnitten entstehen 5'- oder 3'-Überhänge (*sticky ends*), bei geraden Schnitten entstehen glatte Enden (*blunt ends*). Restriktionsenzyme werden zum einen bei der Analyse von Plasmid-DNA (analytischer Verdau) verwendet, da beim Verdau eines DNA-Stücks durch definierte Restriktionsenzyme ein spezifisches Bandenmuster im Agarosegel entsteht, und zum anderen bei Klonierungsarbeiten eingesetzt, um definierte Plasmidfragmente zu erhalten (präparativer Verdau), die anschließend durch Ligation (siehe 3.2.7) zu neuen DNA-Molekülen verbunden werden können. Die Ansätze für den Verdau setzen sich dabei folgendermaßen zusammen:

Analytischer Verdau (10 µl Ansatz)

1 µg DNA
5-10 U Enzym
1 µl 10 x geeigneter Enzympuffer
ad 10 µl H₂O

Präparativer Verdau (100 µl Ansatz)

10-20 µg DNA
50-100 U Enzym
10 µl 10 x geeigneter Enzympuffer
ad 100 µl H₂O

Grundsätzlich ist beim Ansetzen des Verdau zu beachten, dass Enzyme zwar in 50%igem Glycerin gelagert werden, für optimale Reaktionsbedingungen jedoch eine Glycerinkonzentration von unter 5% erforderlich ist. Daher darf der Anteil der Enzymlösung nicht über 10% des Gesamtvolumens steigen. Der Verdau erfolgt bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur für 1-2 Stunden.

3.2.7 Ligation

Durch die Ligationsreaktion werden ein bis zwei DNA-Fragmente, Inserts genannt, in einen zuvor mittels Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektor eingesetzt. Mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase werden diese miteinander verknüpft. Hierbei katalysiert das Enzym die Bildung einer neuen Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe des einen und der 3'-OH-Gruppe des anderen DNA-Moleküls. Dazu werden 0,2 µg Vektor-DNA zu der 2-3fachen molaren Menge an Insert-DNA gegeben. Als Kontrollansatz dient die Vektor-DNA allein. Nach Zugabe von 1 µl 10 x T4-DNA-Ligase-Puffer, 1 U (*sticky ends*) bzw. 10 U (*blunt ends*) T4-DNA-Ligase und H₂O ad 10 µl wird der Ansatz über Nacht bei 15°C oder alternativ (nur bei *sticky ends*) 4-5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Puffer und Lösungen:

50 x Elektrophoresepuffer (EP):	2 M Tris/HCl, pH 7.5
	250 mM Natriumacetat
	50 mM EDTA
	mit Essigsäure auf pH 7.8 einstellen

Ethidiumbromidlösung:	2 µg/ml
-----------------------	---------

Farbmarker (6 x <i>loading dye solution</i>):	MBI Fermentas (St. Leon-Roth)
--	-------------------------------

Durch die Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente elektrophoretisch in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt und über die Interkalation von Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und präpariert werden. Zum Vergleich der DNA-Fragmentlänge und zur Quantifizierung der DNA werden zusätzlich DNA-Längenmarker aufgetragen. Je nach Auftrennungsbereich verwendet man verschiedenprozentige Agarosegele, wobei man kleine Fragmente mit einer hohen, größere Fragmente dagegen mit einer niedrigen Agarosekonzentration auftrennt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1%ige

Agarosegele verwendet. Die Agarose wird in einem entsprechenden Volumen an 1 x Elektrophoresepuffer bis zur Entstehung einer homogenen Lösung in der Mikrowelle aufgekocht und anschließend in einen Gelschlitten gegossen.

Für das Auftragen der Proben auf ein analytisches Gel werden 0,1-1 µg DNA mit 2 µl 6 x Farbmaler versetzt und der Ansatz mit H₂O auf 12 µl aufgefüllt. An das Gel wird eine Spannung von 10 V/Längenzentimeter angelegt. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wird das Gel für zehn Minuten in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und nachfolgend in Wasser für zehn Minuten entfärbt. Anschließend wird die DNA mit Hilfe eines Transluminators bei 254 nm sichtbar gemacht und gegebenenfalls fotografiert.

Bei präparativen Gelen wird der gesamte Verdauansatz (100 µl) mit 20 µl 6 x Farbmaler auf ein Gel mit großen Taschen aufgetragen und wie oben beschrieben fortgefahren. Die Betrachtung und Präparation des Gels erfolgt allerdings zur Vermeidung von UV-Schäden an der zu präparierenden DNA bei einer Wellenlänge von 360 nm.

3.2.9 DNA-Elution aus Agarosegelen

Um die nach einer elektrophoretischen Auftrennung (siehe 3.2.8) erhaltenen DNA-Fragmente z.B. für eine Ligation weiterverwenden zu können, werden diese unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm aus dem Agarosegel mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus dem entnommenen Agaroseblock erfolgt mit dem „QIAquick Gel Extraction“-Kit der Firma *Qiagen* (Hilden) nach dem mitgelieferten Protokoll. Zur Überprüfung der erfolgreichen Elution werden 5 µl der erhaltenen DNA-Lösung mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe 3.2.8).

3.2.10 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR - *polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Amplifikation und gerichteten Modifikation definierter DNA-Bereiche. Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Methode dazu verwendet, DNA-Fragmente zu amplifizieren und Punktmutationen in DNA-Sequenzen einzufügen.

Voraussetzung für die Polymerasekettenreaktion ist das Vorhandensein von 1. einer Matrizen-DNA, welche als Vorlage dient, und an der eine DNA-Polymerase einen komplementären Strang synthetisieren kann, 2. zwei Oligonukleotiden, so genannten *Primern*, die jeweils an einem Ende des zu amplifizierenden Bereichs mit dem (+)-Strang bzw. dem (-)-Strang hybridisieren und der Polymerase als Startpunkt für die Reaktion dienen können, und 3. einer hitzestabilen Polymerase. In dieser Arbeit wurde das Enzym HerculaseTM Hotstart DNA Polymerase der Firma *Stratagene* (La Jolla, USA) eingesetzt,

welches eine Korrekturlesefähigkeit und 3'→5'-Exonukleaseaktivität besitzt und somit eine fehlerfreie Vervielfältigung der gewünschten DNA ermöglicht.

Die PCR läuft nach folgendem Prinzip ab: Nach Hitzedenaturierung der DNA lagern sich die *Primer* bei Abkühlung des Reaktionsansatzes an die jeweiligen Einzelstränge der DNA-Matrize an. Die hitzestabile Polymerase erstellt, ausgehend vom 3'-OH-Ende des jeweiligen hybridisierten *Primers*, einen dem Matrizenstrang komplementären Strang. Nach erfolgter Synthese werden die neu entstandenen Doppelstränge erneut denaturiert, und die Prozedur wiederholt sich. Durch mehrfaches Wiederholen dieses Zyklus erreicht man so eine exponentiell verlaufende Amplifikation des gewünschten DNA-Bereichs.

Ein typischer PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzt sich folgendermaßen zusammen (die einzelnen Komponenten des Ansatzes sollen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert werden):

<u>Komponente</u>	<u>Quantität pro Reaktion</u>
Aqua dest.	X µl ad 50 µl
10 x Herculase-Reaktionspuffer	5,0 µl
dNTP-Gemisch (2,5 mM jedes dNTPs)	4,0 µl
DNA-Matrize	50 ng Plasmid-DNA
<i>Primer 1</i>	100 ng
<i>Primer 2</i>	100 ng
Herculase™ Hotstart DNA Polymerase	0,5 µl

Nach dem Ansetzen der Proben werden diese vorsichtig gemischt, nochmals kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, in PCR-Reaktionsröhrchen überführt und mit je 50 µl Mineralöl (*Sigma-Aldrich*, Steinheim) überschichtet, um ein Verdampfen des Reaktionsgemischs während der Amplifikation zu verhindern.

Anschließend erfolgt die Amplifikation der Proben nach folgendem Protokoll:

<u>Segment</u>	<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1 (Denaturierung)	1	94°C	2 Minuten
2a (Denaturierung)	30	94°C	30 Sekunden
b (Hybridisierung)		57°C (abhängig von der Wahl der <i>Primer</i>)	30 Sekunden
c (Synthese)		72°C	60 Sekunden
3	1	4°C	10 Minuten - 16 Stunden

Anschließend werden 5 µl der Reaktion mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Wenn das DNA-Fragment als scharfe Bande bei der erwarteten Laufweite im Agarosegel erkennbar ist, wird das restliche Volumen des PCR-Reaktionsansatzes in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Fragmente aufgereinigt (siehe 3.2.8 und 3.2.9).

3.2.11 Oligonukleotidsynthese

Die Oligonukleotidsynthese wurde in der Abteilung „Oligonukleotidsynthese und DNA-Sequenzierung“ des DKFZ, Heidelberg, durchgeführt.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Lagerung und Kultur eukaryotischer Zellen

Die Kultur sämtlicher im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in DMEM^k für adhärente Zellen bzw. in RPMI^k-Medium für Suspensionszellen. Die Zellen werden in regelmäßigen Abständen gesplittet, um ein Absterben der Zellen durch Kontaktinhibition oder durch eine Unterversorgung zu vermeiden. Adhärente Zellen (293T- und TZM-bl-Zellen) werden dazu vom Boden der Kulturschale gelöst, indem man sie mit Trypsin behandelt: Nach dem Abnehmen des alten Mediums von der Platte und einem Waschschrift mit 10 ml PBS gibt man 10 ml der Trypsinlösung zu den Zellen, schwenkt die Platte, so dass sich die Flüssigkeit gleichmäßig verteilt, und nimmt mit der Pipette alles bis auf etwa 1 ml der Lösung ab. Dann wird die Platte für ca. drei Minuten bei 37°C gehalten, anschließend können die Zellen durch vorsichtiges Klopfen an der Petrischale vom Boden gelöst, in einem geeigneten Volumen an frischem DMEM^k aufgenommen und je nach Bedarf auf neue Platten verteilt werden. Die Splittung von Suspensionszellen (Hybridomzellen) erfolgt durch Abnahme eines Teils der Kultur und dessen Überführung mit einem entsprechenden Volumen an frischem RPMI^k-Medium in eine neue Kulturflasche. Semiadhärente SP2/0-Zellen werden vorher mit einem Zellschaber gelöst.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen findet in flüssigem Stickstoff statt. Die gewünschte Menge an Zellen wird bei 1.200 rpm für zehn Minuten bei Raumtemperatur in der Heraeus-Minifuge abzentrifugiert, in einem geeigneten Volumen an gekühltem Einfriermedium aufgenommen (siehe 2.13.2) und in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Damit die Zellen

langsam abkühlen, werden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und über Nacht bei -70°C gelagert. Daraufhin werden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen von Zellen erfolgt zügig im 37°C -Wasserbad. Um das im Einfriermedium enthaltene, für die Zellen toxische DMSO zu entfernen, wird der Inhalt des Röhrchens in 9 ml auf 37°C vorgewärmtes Medium überführt. Die Zellen werden daraufhin bei Raumtemperatur für zehn Minuten bei 1.200 rpm in der Heraeus-Minifuge abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in einem geeigneten Volumen an frischem Medium aufgenommen.

Alle Arbeiten, die im Zusammenhang mit der Kultur eukaryotischer Zellen stehen, werden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung der Neubauer Zählkammer. Die in der Kammer gezählte Zahl von Zellen muß mit dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert werden, um die Menge von Zellen in 1 ml Zellsuspension zu erhalten.

3.3.3 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion in Zellkulturschalen

Puffer und Lösungen:

2 x HBS-Puffer:	50 mM HEPES, pH 7.2
	280 mM NaCl
	1,5 mM Na_2HPO_4
	auf pH 7.13 einstellen, steril filtrieren

CaCl_2 -Lösung	2,5 M
-------------------------	-------

Plasmid-DNA bildet mit Kalzium-Phosphat Präzipitate, welche von adhärenen eukaryotischen Zellen sehr effektiv endozytotisch aufgenommen werden.

Für die Transfektion von 293T-Zellen in 55 cm^2 große Zellkulturschalen werden 3-10 μg der jeweiligen Plasmid-DNA ad 450 μl mit sterilem H_2O verdünnt und mit 50 μl 2,5 M CaCl_2 zu einem Endvolumen von 500 μl gemischt. Zur Herstellung von Env^{WT}- und Env^{Fus}-PV werden jeweils 10 μg Plasmid-DNA des Verpackungskonstrukts (siehe 4.1.1) und des entsprechenden Env-Expressionskonstrukts verwendet (siehe 4.1.2). Bei CD4/X4-PV werden 10 μg Plasmid-DNA des Verpackungskonstrukts und 6 μg bzw. 3 μg des CXCR-4- bzw. CD4-Expressionskonstrukts verwendet (siehe 4.1.3). Diese DNA-Lösung wird tropfenweise zu 500 μl 2 x HBS-Puffer gegeben, gut gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Inkubationszeit bilden sich die oben erwähnten Kalzium-

Phosphat-Präzipitate, was an der langsamen Trübung des Gemischs zu erkennen ist. Nach der Inkubationszeit wird die Lösung tropfenweise zu den halbdicht gewachsenen 293T-Zellen gegeben, welche dann für vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert werden. In dieser Zeit nehmen die Zellen die DNA-Kalzium-Phosphat-Aggregate auf. Nach der Inkubation werden die Zellen gewaschen, indem man das alte Medium abnimmt und frisches Medium zugibt. Die Ernte der transfizierten Zellen bzw. des Zellkulturüberstands erfolgt zwei bis drei Tage nach der Transfektion (pt, *post transfection*).

Allgemein ist bei der Transfektion zu beachten, dass der Transfektionsansatz die Menge von einem Zehntel des Medienvolumens nicht überschreitet.

Bei Transfektionen von 293T-Zellen in 154 cm²-Zellkulturschalen werden jeweils die dreifache Menge der Plasmid-DNA und der entsprechenden Lösungen eingesetzt.

3.3.4 Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion in Zell-Factories

Zur Herstellung großer Mengen an Pseudovirionen kommt die transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion in Zell-Factories zum Einsatz. In Zell-Factories mit einer Gesamtfläche von 6260 cm² werden am Vortag der Transfektion 293T-Zellen in einem Liter DMEM^k so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion halbdicht wachsen. Um eine Kontrolle der 293T-Zellen und der Kalzium-Phosphat-Präzipitate unter dem Durchlichtmikroskop zu ermöglichen, werden auch 10 ml des einen Liters der resuspendierten und verdünnten 293T-Zelllösung auf eine 55 cm²-Zellkulturschale ausgesät.

Zur Herstellung von Env^{WT}- und Env^{Fus}-PV werden jeweils 1,2 mg Plasmid-DNA des Verpackungskonstrukts und des entsprechenden Env-Expressionskonstrukts verwendet. Bei CD4/X4-PV werden 1,2 mg Plasmid-DNA des Verpackungskonstrukts und 600 µg bzw. 360 µg des CXCR-4 bzw. CD4-Expressionskonstrukts eingesetzt. Die DNA wird ad 49,5 ml mit sterilem H₂O verdünnt und mit 5,5 ml 2,5 M CaCl₂ auf ein Endvolumen von 55 ml aufgefüllt. Danach werden 2 x 15 ml und 2 x 12,5 ml der CaCl₂/DNA-Lösung zu jeweils gleichen Volumen HBS (2 x 15 ml und 2 x 12,5 ml), welches in Erlenmeyerkolben vorgelegt wurde, gegeben. Dieser Vorgang erfolgt schnell, um eine gute Durchmischung der beiden Lösungen zu erreichen. Nach fünf Minuten werden die 110 ml der Kalzium-Phosphat-Präzipitatlösung mit 250 ml frischem DMEM^k gemischt und mit dem vorsichtig entleerten 1 Liter Zellkulturüberstand der Zell-Factory vereint (Gesamtvolumen von 1,36 Liter). Diese Lösung wird behutsam in die Factory überführt und die 293T-Zellen damit vorsichtig überschichtet. Zur Begutachtung der Präzipitate unter dem Durchlichtmikroskop werden zusätzlich 3 ml dieser Lösung auf die 55 cm²-Kontrollplatte überführt. Nach einer Inkubation von vier Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank wird das alte Medium abgenommen und 1000 ml frisches Medium (DMEM mit 0,5% FCS) zugegeben. Zwei bis drei Tage nach

der Transfektion werden die 1000 ml Zellkulturüberstand zum Entfernen der Zellen und Zellfragmente durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und anschließend ultrafiltriert (siehe 3.3.6) und ultrazentrifugiert (siehe 3.3.5).

3.3.5 Aufreinigung von Pseudovirionen durch Ultrazentrifugation

Der durch einen 0,45 µm-Filter filtrierte Zellkulturüberstand wird vorsichtig auf ein Saccharosekissen aufgetragen. Das Saccharosekissen besteht bei SW41Ti-Zentrifugenröhrchen aus 2 ml bzw. bei SW28-Zentrifugenröhrchen aus 5 ml einer 20%igen Saccharoselösung in PBS. Nachfolgend wird das Röhrchen mit Zellkulturmedium vollständig aufgefüllt. Die Ultrazentrifugation erfolgt bei 4°C in einem SW41Ti bzw. SW28-*swing-out*-Rotor für drei bzw. vier Stunden bei 35.000 bzw. 21.000 rpm unter Aufbau eines Vakuums. Der Überstand wird nach Beendigung des Zentrifugenlaufs zuerst vorsichtig mit einer 10 ml-Pipette abgenommen. Das restliche Volumen wird vollständig mit einer 100 µl-Pipette entfernt. Die Wände des Röhrchens werden mit Zellstoff gereinigt und das nicht sichtbare Pellet in einem geeigneten Volumen PBS resuspendiert.

3.3.6 Aufreinigung von Pseudovirionen durch Ultrafiltration

3.3.6.1 Ultrafiltrationsfiltereinheit

Bei der Ultrafiltration unter Verwendung der *Vivaflow* 200 Filtereinheiten der Firma *Vivascience* (Hannover) können schnell große Volumen von Pseudovirionen aufkonzentriert werden. Im Rahmen der Arbeit betrifft dies die in den *Zell-Factories* produzierten Pseudovirionen (siehe 3.3.4). Die Einheit besitzt eine semipermeable Membran mit einem *cutoff* von 100 kDa, die während der Ultrafiltration im Medium gelöste hochmolekulare Substanzen auf Basis der Molekülgröße vom Medium trennt.

Die Filtration sowie Reinigung und Lagerung der Filtereinheit verlaufen, mit kleinen Variationen, weitgehend nach dem Protokoll des Herstellers. Zunächst wird die Filtereinheit mit 500 ml deionisiertem H₂O gewaschen. Danach wird ein Liter filtrierter Zellkulturüberstand (Ø 0,45 µm-Filter) aus einer *Zell-Factory* ultrafiltriert und die Lösung so bis auf etwa 35 ml konzentriert. Einmal während der Filtration und unmittelbar vor der Entleerung des Konzentrats aus dem Kreislauf wird die Auslassöffnung des Filtrats für vier Minuten geschlossen. Das Konzentrat zirkuliert dann bei Filtrationsdruck, wodurch eine „Kuchenbildung“ vermieden wird. Nach dem Entleeren der Filtrationskassette wird diese mit ca. 50 ml PBS gespült. Das erhaltene PV-Konzentrat wird anschließend durch eine 20%ige

Saccharoseschicht ultrazentrifugiert (siehe 3.3.5) und das entstandene Pellet in 200 µl PBS aufgenommen.

Zur Reinigung der Filtereinheit wird diese zehn Minuten mit 200 ml PBS, und 30 Minuten mit 0,5 M NaOH-Lösung gespült. Im Anschluss an den Leerlauf des Systems wird zweimal mit PBS (500 ml) gewaschen und die Filtereinheit mit 10%igem Ethanol befüllt gelagert.

3.3.6.2 Ultrafiltrationssäulen

Die Methode der Ultrafiltration über Säulen der Firma *Vivascience* (Hannover) dient zur schnellen Konzentration kleiner Volumen von Pseudovirionen. Im Rahmen der Arbeit wurden in transfizierten 293T-Zellen produzierte Pseudovirionen aufkonzentriert. Die Säulen besitzen eine semipermeable Membran mit einem *cutoff* von 100 kDa, die während eines Zentrifugationsschritts im Medium gelöste hochmolekulare Substanzen auf Basis der Molekülgröße vom Medium trennt.

Je 20 ml des filtrierten (Ø 0,45 µm) Transfektionsüberstands werden auf die Säulen geladen, welche anschließend bei 3.000 rpm (*Heraeus* Minifuge) und Raumtemperatur zentrifugiert werden. Nach 15 Minuten hat ein Teil des geladenen Transfektionsüberstand die Membran passiert. Nach Bedarf kann weiterer Transfektionsüberstand auf die Säulen gegeben und durch weitere Zentrifugationsschritte bis zum gewünschten Endvolumen aufkonzentriert werden.

3.4 Infektionen und Transduktionen

3.4.1 Infektiosität von Pseudovirionen oder fusionierten PV-Strukturen

Zur Bestimmung der Infektiosität von Env^{WT}-PV oder von fusionierten PV-Strukturen wird als indirekter Assay die Luziferasegentransduktion in Zielzellen verwendet. Env^{WT} (Luzi+)-, Env^{WT} (Luzi-)- und CD4/X4 (Luzi+)-PV in filtrierten (Ø 0,45 µm-Filter) Zellkulturüberständen transfizierter 293T-Zellen werden auf CA-Mengen abgeglichen (CA-ELISA siehe 3.6.8). Env^{WT} (Luzi-)- und CD4/X4 (Luzi+)-PV werden in einem Verhältnis 1:1 gemischt und bei 37°C und 5% CO₂ für 90 Minuten inkubiert. Diesem Gemisch wird vor der Inkubation noch Polybren in einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugegeben. 1-3 µg Env^{WT}-PV (Luzi+) (CA) oder 2-6 µg des PV-Gemischs (CA) werden auf CD4- und CXCR-4-exprimierende 293T-Zellen gegeben, die am Vortag in 12well-Zellkulturplatten plattiert wurden. Die Schalen werden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Bestimmung der Luziferaseaktivität von Zelllysaten der transduzierten 293T-Zellen erfolgt nach drei Tagen (siehe 3.6.11).

3.4.2 Kinetik der PV-Fusion

Zur Untersuchung der PV-Fusionskinetik zwischen HIV-Env^{WT} (Luzi-)- und CD4/X4 (Luzi+)-PV werden über einen CA-ELISA (siehe 3.6.8) abgeglichene Mengen von 1-3 µg/ml (CA) von CD4/X4 (Luzi+)-PV mit HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV (wie HIV-Env^{WT}-PV hergestellt, allerdings mit zusätzlichen 10 µg pHITamph.MuLV-Env in der Transfektion), die beide in Zellkulturüberständen vorliegen, gemischt. Die interretrovirale Membranfusion wird durch HIV-Env ermöglicht, und der für die Transduktion erforderliche Eintritt der fusionierten Strukturen in die 293T-Zellen, welche *nicht* den zellulären HIV-1-Rezeptorkomplex CD4 und CXCR-4 exprimieren, wird durch MuLV-Env vermittelt. Das Abstoppen der PV-Fusion erfolgt mit CD4-Antikörpern (Sim2/Sim4). Im Einzelnen werden die auf CA abgeglichenen Zellkulturüberstände von CD4/X4- und HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV auf 37°C erwärmt und jeweils 0,9 ml davon in vier verschiedenen Reaktionsgefäßen gemischt (ergibt 1,8 ml), wobei im ersten der vier Ansätze bereits 0,2 ml einer 1:1 Mischung von Sim2/Sim4-Hybridomzellkulturüberständen vorgelegt wird. Dies entspricht einer Endkonzentration von ca. 1 µg/ml CD4-Antikörpern. Durch diese Antikörper wird eine Fusion der beiden PV-Arten aufgrund der Bindung und Blockierung an bzw. von CD4 von vornherein unmöglich. Nach einer Inkubation des PV-Gemischs für 20, 40 bzw. 60 Minuten bei 37°C werden den verbleibenden drei Reaktionslösungen ebenfalls je 0,2 ml des Sim2/Sim4-Gemischs zugegeben. Die Versuchsansätze mit den darin enthaltenen Pseudovirionen und CD4-Antikörpern werden auf halbkongfluente 293T-Zellen in einer 12well-Zellkulturplatte gegeben. Nach der Infektion werden die Zelllysate drei Tage nach der Transduktion auf ihre Luziferaseaktivität hin getestet (siehe 3.6.11).

3.4.3 Virusneutralisations-Assay

Zur Analyse der Neutralisationskapazität von Antikörpern gegen unterschiedliche Virusisolate werden jeweils 50 µl verschiedener Verdünnungen von 1. Hybridomzellkulturüberständen (unverdünnt bis 1:1000), 2. rekombinanten, aufgereinigten Antikörpern (100 - 0,1 µg/ml), 3. Seren immunisierter und nichtimmunisierter Versuchstiere (Verdünnungen: 1:10 - 1:1250) und 4. IgG-Fractionen aus affinitätsaufgereinigten und ultrafiltrierten Rattenserum (Verdünnungen im Bezug zum Serum: 1:10 - 1:50) in einem Labor der Sicherheitsstufe 3 mit 50 µl 10-100 infektiösen Einheiten (IU) homologer und/oder heterologer Viren gemischt und für drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Viren

wurden entweder von V. Bosch, O. Keppler oder M. Dittmar, Heidelberg, zur Verfügung gestellt, oder aus MT4-Zellen nach einer Infektion mit dem Virus pNL4-3^{BH10} erhalten. Die Verdünnungen erfolgen jeweils in DMEM^k, und Mischung und Inkubation finden in 96well-PS-*microplates* mit geringer Bindungsaffinität statt (siehe 2.15). 100 µl des Antikörper/Virus-Gemischs werden nun auf 70%ig konfluent gewachsene TZM-bl-Zellen in 96well-Zellkulturplatten gegeben und 36 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach erfolgt der Nachweis der zellulären β-Galaktosidase-Expression (siehe 3.6.10).

3.5 Herstellung des PV-Vakzins

3.5.1 Herstellung des Wt-PV-Vakzins (Env^{WT}-Vakzin, chemische Fixierung)

Env^{WT}- und CD4/X4-PV werden in transienten Transfektionen von 293T-Zellen in Zellkulturschalen (siehe 3.3.3) oder Zell-*Factories* (siehe 3.3.4) hergestellt. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion werden die entsprechenden Zellkulturüberstände durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und anschließend entweder ultrazentrifugiert (siehe 3.3.5) oder ultrafiltriert (siehe 3.3.6.1) mit anschließender Ultrazentrifugation (siehe 3.3.5). Der PV-Niederschlag wird dann in 100-200 µl PBS aufgenommen. Die Menge an Pseudovirionen (CA) wird mit Hilfe eines CA-ELISA bestimmt (siehe 3.6.8) und die abgeglichenen und benötigten äquivalenten Mengen an beiden Pseudovirionenarten gemischt. Zuvor wird Polybrene in einer Endkonzentration von 8 µg/ml beigelegt. Anschließend wird das Gemisch bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 5, 20 und 60 Minuten werden dem Versuchsansatz jeweils 1/3 des Volumens entnommen und die Fusion durch eine Inkubation bei 0°C in einem Eis/NaCl-Gemisch abgestoppt. Nach fünf Minuten wird dem Reaktionsgemisch das gleiche Volumen einer 0,3%igen Glutaraldehydlösung in PBS schnell und unter gleichzeitigem Schnippen an das Eppendorfgefäß zugegeben (Endkonzentration von 0,15%). Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis werden die eventuell noch vorhandenen freien Aldehydgruppen des chemisch fixierten Env^{WT}-Vakzins mit 1/10 des Volumens des Reaktionsgemischs mit einer 9%igen Glycinlösung in PBS neutralisiert (Endkonzentration 0,9%, 8 molar) und erneut mindestens 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Ansätze der drei verschiedenen Inkubationszeiten werden vereint und bis zur Immunisierung bei -70°C gelagert.

3.5.2 Herstellung des PV-Vakzins mit mutiertem HIV-1-Env (Env^{Fus}-Vakzin, genetische Fixierung)

Env^{Fus}- und CD4/X4-PV werden in transienten Transfektionen von 293T-Zellen in Zellkulturschalen (siehe 3.3.3) oder Zell-*Factories* (siehe 3.3.4) hergestellt. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion werden die entsprechenden Zellkulturüberstände durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und danach entweder ultrazentrifugiert (siehe 3.3.5) oder ultrafiltriert (siehe 3.3.6.1) und anschließend ultrazentrifugiert (siehe 3.3.5). Der PV-Niederschlag wird dann in 100-200 µl PBS aufgenommen. Die Menge an Pseudovirionen (CA) wird mit Hilfe eines CA-ELISA bestimmt (siehe 3.6.8) und die abgeglichenen und benötigten äquivalenten Mengen an beiden Arten von Pseudovirionen gemischt. Nach Zugabe von Polybren in einer Endkonzentration von 8 µg/ml wird das Gemisch bei 37°C und 5% CO₂ für drei Stunden inkubiert und die Reaktion anschließend durch eine Inkubation auf Eis abgestoppt. Bis zur Immunisierung wird das Env^{Fus}-Vakzin bei -70°C gelagert.

3.6 Proteinanalyse

3.6.1 Indirekte Immunfluoreszenz

Die indirekte Immunfluoreszenz wird zur Untersuchung der Transfektionseffizienz sowie zur Kontrolle der Proteinexpression in transfizierten Zellen eingesetzt. Adhärente 293T-Zellen, die auf Deckgläschen anhaften, werden durch Inkubation für mindestens 20 Minuten in einem -20°C kalten Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) fixiert und zugleich permeabilisiert. Anschließend werden die Deckgläschen an der Luft getrocknet, in eine feuchte Kammer überführt und für 30 Minuten bei 37°C mit 50 µl 1%iger BSA-Primärantikörperlösung oder in 50 µl unverdünntem Hybridomüberstand inkubiert. Nach der Entfernung des ungebundenen Primärantikörpers durch zehnminütiges Waschen in PBS werden 50 µl der 1%igen BSA-Sekundärantikörperlösung mit zugesetztem DAPI (1 µg/ml) auf die Zellen gegeben. Die DAPI-Färbung dient zur Anfärbung von Zellkernen. Darauf folgt eine weitere Inkubation für 30 Minuten bei 37°C. Anschließend wird der überschüssige Zweitantikörper durch zehnminütiges Waschen in PBS entfernt. Die Deckgläschen bzw. Objektträger werden je einmal kurz in H₂O und anschließend in 100%iges Ethanol getaucht, an der Luft getrocknet und anschließend in Elvanol eingebettet. Die Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop bei der für das jeweils verwendete Fluorochrom entsprechenden Wellenlänge.

3.6.2 Partikelimmunfluoreszenz

Die Partikelimmunfluoreszenz ermöglicht die Visualisierung einzelner Pseudovirionen durch eine indirekte Immunofärbung unter dem konfokalen Mikroskop (Pizzato *et al.*, 1999). 50 µl eines PV-Zellkulturüberstands oder 1 µl eines PV-Konzentrats, verdünnt in 50 µl PBS, wird Polybren bis zu einer Endkonzentration von 8 µg/ml zugegeben und auf etwa 1 cm² eines Objektträgers (Bereich zuvor mit Fettstift abgrenzen) aufgetragen, der für eine Stunde bei 37°C inkubiert wird. Polybren soll die Adhäsion von Viruspartikeln an die Oberflächen des Objektträgers vermitteln. Danach wird die Lösung abgenommen und der Objektträger zehn Minuten in PBS gewaschen. Die Inkubation mit 50 µl der *ersten* Primärantikörperlösung (EGFR, H902, Chessie 8 oder rb α-gp120, in der entsprechenden Verdünnung) erfolgt für eine Stunde bei 37°C. Hierbei werden Glykoproteine in der viralen Membran angefärbt, weshalb keine Permeabilisierung der viralen Membran an dieser Stelle notwendig ist. Nach einem zehnminütigen Waschschrift in PBS werden 50 µl der jeweiligen *ersten* Sekundärantikörperlösung zugegeben, und der Objektträger für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird der ungebundene überschüssige Zweitantikörper durch zehnminütiges Waschen in PBS entfernt. Nach einer 15-minütigen Fixierung mit 4%igem PFA in PBS und einem zehnminütigen Waschschrift werden die Viren für 15 Minuten mit 0,2%igem Triton X-100 in PBS bei Raumtemperatur permeabilisiert. Es folgt ein weiterer Waschschrift in PBS. Anschließend werden die Pseudovirionen mit 50 µl der *zweiten* Primärantikörperlösung (Mab183) für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des ungebundenen Antikörpers durch einen Waschschrift wird die Inkubation mit je 50 µl des *zweiten* Sekundärantikörpers für eine Stunde bei 37°C angeschlossen. Es folgt ein erneuter Waschschrift. Während des gesamten Protokolls sollten die Präparationen nie austrocknen. Die Viren werden leicht feucht in Elvanol eingebettet, bevor die Betrachtung der Zellen unter dem konfokalen Mikroskop bei der für das jeweils verwendete Fluorochrom geeigneten Wellenlänge erfolgt.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer und Lösungen:

Lösung A _{Kornberg} :	30% Acrylamid
	0,15% Bisacrylamid

Lösung A _{Laemmli} :	30% Acrylamid
	0,8% Bisacrylamid

Lösung B:	1,5 M Tris/HCl, pH 8.8 0,4% SDS
Lösung C:	0,75 M Tris/HCl, pH 6.8 0,4% SDS
2 x SB (<i>sample buffer</i>):	0,125 M Tris/HCl, pH 6.8 4% SDS 10% β -Mercaptoethanol 10% Glycerol 0,002% Bromphenolblau
5 x Laufpuffer:	60 g Tris 285 g Glycin 10 g SDS ad 2000 ml VE-H ₂ O

Proteine können mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Das im Probenauftragspuffer (SB) befindliche β -Mercapthoethanol ist in der Lage, intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zu zerstören. Das Detergenz SDS denaturiert und überlagert zudem durch die negative Ladung der Sulfatreste die Eigenladung der Aminosäuren. Aus diesem Grund haben denaturierte Proteine eine gleiche Ladungsverteilung, wodurch die Ladung der Proteine direkt proportional zu ihrer Größe ist. Deshalb können die Proteine dann in einer Gelmatrix ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt und analysiert werden.

Bei dem hier verwendeten Gelsystem handelt es sich um ein diskontinuierliches System, welches aus einem 4%igen Sammelgel und einem 15%igen Trenngel besteht, wobei der Vernetzungsgrad der beiden Geltypen verschieden ist und dadurch, wie die Namen schon sagen, vor der eigentlichen Auftrennung der Proteine eine Konzentration ermöglicht. Die Gele setzen sich wie folgt zusammen:

15%iges Kornberg / Laemmli-Gel**Sammelgel:**

Lösung A _{Laemmli}	567,0 µl
Lösung C	1,1 ml
H ₂ O	2,7 ml
10% APS	44,0 µl
TEMED	4,4 µl

Trenngel:

Lösung A _{Kornberg}	2,2 ml
Lösung B	1,1 ml
H ₂ O	1,1 ml
10% APS	60 µl
TEMED	3 µl

Die Proteinproben werden mit dem entsprechenden Volumen an 2 x SB-Puffer versehen, für zehn Minuten im Wasserbad aufgeköcht, kurz abzentrifugiert und dann auf das Gel aufgetragen. Als Referenz werden 5 µl *low range*-Marker der Firma *Bio-Rad Laboratories* (Hercules, USA), versetzt mit 15 µl 2 x SB-Puffer, verwendet. Der Gellauf erfolgt in einer vertikalen, mit 1 x Laufpuffer gefüllten Gelkammer bei 1 V/cm².

3.6.4 Coomassie-Blau-Färbung von Proteingelen**Lösungen:**

Coomassie-Blau-Färbelösung I:	GelCode Blue Stain Reagent (<i>Pierce Perbio</i> , Bonn)
Coomassie-Blau-Färbelösung II:	0,6 g/l Coomassie brilliant blue R250 (<i>Serva</i> , Heidelberg) 50% Methanol 10% Essigsäure
Coomassie-Blau-Entfärbelösung:	7,5% Essigsäure 5% Methanol

Die durch die denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinbanden können ab einer Proteinkonzentration von ca. 200 ng mit der Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff färbt zunächst das ganze Gel einheitlich blau, löst sich beim Entfärben aber wieder aus der Gelmatrix. Die Proteinbanden bleiben angefärbt. Das Gel wird dafür für eine Stunde oder über Nacht in Coomassie-Blau-Färbelösung I oder II leicht geschwenkt. Ist das Gel vollständig gefärbt, wird es in H₂O (nach Coomassie-Blau-Färbelösung I) oder in die Entfärbelösung (nach Coomassie-Blau-Färbelösung II) gelegt. Die Lösung wird solange gewechselt, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar werden.

Anschließend wird das Gel luftblasenfrei zwischen zwei *Gel Drying*-Folien ausgebreitet und über Nacht bei 37°C getrocknet.

3.6.5 Western Blot und ECL (*enhanced chemoluminescence*)

Lösungen und Materialien:

Boratpuffer:	20 mM Borsäure
	1 mM EDTA
	0,1 mM DTT
	pH 8.8

Lösung 1 (Blockierlösung):	10% BSA, 10% Tween-20 in PBS
----------------------------	------------------------------

Lösung 2 (Waschlösung):	1% BSA, 1% Tween-20 in PBS
-------------------------	----------------------------

Primärantikörperlösung:	Primärantikörper verdünnt in Lösung 2
-------------------------	---------------------------------------

Sekundärantikörperlösung:	Sekundärantikörper verdünnt in Lösung 2
---------------------------	---

ECL-Lösung:	<i>Amersham</i> (Uppsala, Schweden)
-------------	-------------------------------------

Immobilon-Membran:	<i>Millipore</i> (Bedford, USA)
--------------------	---------------------------------

Methanol

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse können Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Dabei werden Proteine, welche durch die SDS-Gelelektrophorese (siehe 3.6.3) aufgetrennt wurden, auf eine Immobilon-Membran transferiert. Auf dieser Membran können dann anschließend die gewünschten Proteine immunochemisch detektiert werden. In dieser Arbeit wird das Naßblot-Tanksystem der Firma *Bio-Rad* (Hercules, USA) verwendet.

Nach Beendigung des SDS-PAGE-Gellaufs wird das Trenngel vom Sammelgel abgelöst und kurz in Wasser und Boratpuffer geschwenkt. Anschließend wird die Naßblot-Apparatur folgendermaßen aufgebaut:

Anode (+)
Schwamm
2 x Whatman-Papier
Membran, 5 sek. in Methanol, dann kurz in VE-Wasser und Boratpuffer geschwenkt
Gel
2 x Whatman-Papier
Schwamm
Kathode (-)

Der Transfer erfolgt in Boratpuffer für 90 Minuten bei 60 Volt mit maximal 350 mA. Anschließend wird die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Blockierlösung inkubiert, bevor sie dann in der Primärantikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C geschwenkt wird. Nach dreimaligem Waschen für je zehn Minuten in der Waschlösung wird die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Sekundärantikörperlösung inkubiert und anschließend erneut dreimal für je zehn Minuten in der Waschlösung gewaschen. Bevor ein Röntgenfilm der Membran ausgesetzt wird, wird diese in einem letzten Waschschrift für eine Minute in der ECL-Lösung geschwenkt. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym HRP (Meerrettich-Peroxidase) katalysiert dabei die Oxidation des Substrats der ECL-Lösung und führt über einen angeregten Zustand zur Chemolumineszenz, welche durch die Exposition des ECL-Films abgelichtet wird.

3.6.6 Strippen von gefärbten Western-Blot-Membranen

Mit Hilfe dieser Methode können die an eine Western-Blot-Membran gebundenen Antikörper durch Denaturierung entfernt werden, wodurch eine Detektion anderer auf der Membran befindlicher Proteine mit weiteren spezifischen Antikörpern möglich wird. Die Membran wird hierfür unter Schwenken für fünf Minuten in 0,2 M NaOH inkubiert und kurz mit Waschlösung (siehe 2.12) gewaschen und erneut in Blockierlösung gelegt. Das weitere Vorgehen erfolgt nach dem unter 3.6.5. beschriebenen Protokoll.

3.6.7 Herstellen von Zell- und Viruslysaten (1% Triton X-100)

Von den zu lysierenden Zellen wird das Medium abgenommen und nach einmaligem Waschen in PBS 200 µl Lysepuffer (1% Triton X-100 in PBS, versetzt mit 1 x Proteaseinhibitor) zugegeben. Das Lysat wird bei 4°C für zehn Minuten mit 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand, welcher sowohl zytoplasmatische Proteine

als auch Membranbestandteile enthält, wird vom kernhaltigen Pellet abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Lysate von durch Ultrazentrifugation gewonnenen aufgereinigten Pseudovirionen werden durch die Zugabe eines Lysepuffers (siehe oben) zu PV-Pellets und einem Auf- und Abpipettieren erhalten.

Die Lagerung der Zell- und Viruslysate erfolgt bei -20°C .

3.6.8 CA-ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)

Zum Nachweis von CA, dem HIV-1-Kapsidprotein, kommt der ELISA-Kit *InnotestTM HIV Antigen mAb* der Firma *Innogenetics* (Gent, Belgien) zum Einsatz. Die Durchführung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers. Die Auswertung erfolgt an einem ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.6.9 gp120-, gp41-, CA- und BSA-Antikörper-ELISA

Puffer und Lösungen:

Casein-Blockpuffer : 0,2% Casein
 0,05% Tween
 in PBS

Waschpuffer : 0,05% Tween
 in PBS

ELISA-Puffer: 100 mM Natriumacetat
 mit Essigsäure auf pH 6.0 einstellen

TMB-Puffer: 10 mg/ml TMB
 in DMSO

TMB-Substrat : 10 ml ELISA-Substrat
 100 μl TMB-Puffer
 1 μl H_2O_2

Stopp-Puffer: 1M H_2SO_4

Die Vertiefungen einer 96well-ELISA-Platte werden zur Untersuchung der Antikörpertiter in Seren, IgG-Fractionen oder Hybridomüberständen mit jeweils 50 µl des jeweiligen in PBS verdünnten Proteins über Nacht bei 4°C behandelt. Die hierbei verwendeten Mengen Protein sind: 15 ng gp120 und / oder 50 ng gp41 oder 100 ng CA oder 100 ng BSA pro well. Nachdem der Überstand abgegossen wurde, werden unspezifische Bindungsstellen auf der Platte mit Casein-Blockpuffer für fünf Stunden bei Raumtemperatur blockiert. Nach fünf Waschschritten mit je 200 µl Waschpuffer pro well werden diese mit 50 µl der jeweiligen unverdünnten oder in Casein-Blockpuffer verdünnten Primärantikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss an zehn Waschschritten werden 50 µl der jeweiligen Sekundärantikörperlösung (siehe 2.1.2) (1:8000 Verdünnung in Casein-Blockpuffer) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die wells gegeben. Nach weiteren zehn Waschschritten mit 200 µl Waschpuffer pro well erfolgt die Zugabe von je 100 µl TMB-Substrat pro Vertiefung. Der Farbumschlag des Indikators verläuft von farblos über schwachblau nach blau. Die Messung der Wellenlänge bei 450 nm erfolgt in einem ELISA-Lesegerät nach 15-30 Minuten nach Zugabe von 50 µl Stopp-Puffer.

3.6.10 Nachweis zellulärer β -Galaktosidase-Expression (X-Gal-Assay)

Puffer und Lösungen:

Fixierlösung: 1% Formaldehyd
 0,2% Glutaraldehyd
 in PBS

X-Gal-Lösung: 1 mg/ml X-Gal in DMSO
 4 mM $K_3Fe(CN)_6$
 4 mM $K_4Fe(CN)_6$
 2 mM $MgCl_2$
 in PBS

Zellen, welche in ihrem Genom das *lacZ*-Gen besitzen und das Enzym β -Galaktosidase exprimieren, können mit diesem Nachweisverfahren blau angefärbt werden. Im Rahmen der Arbeit wurden TZM-bl-Zellen mit diesem Nachweisverfahren angefärbt, um die Konzentration funktioneller infektiöser Einheiten (IU, *infectious units*) in virionenhaltigem Zellkulturüberstand oder Viruskonzentraten mit oder ohne vorherige Antikörperinkubation zu bestimmen.

Dafür werden die in einer 96well-Platte kultivierten TZM-bl-Zellen einmal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 200 µl der Fixierlösung für fünf Minuten fixiert und anschließend erneut zweimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl der X-Gal-

Lösung erfolgt die Blaufärbung der Zellen bei 37°C für bis zu 24 Stunden. Die Zählung der X-Gal-gefärbten Zellen erfolgt unter dem Durchlichtmikroskop.

3.6.11 Nachweis zellulärer Luziferaseexpression

Der Nachweis der durch Virus transduzierten LTR-induzierten Luziferaseexpression wird mit den Reagenzien des *Luciferase Assay System*-Kits der Firma *Promega* (Madison, USA) nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. CD4- und CXCR-4-exprimierende 293T-Zellen wurden zur Messung der Infektiosität von Pseudovirionen oder von fusionierten PV-Strukturen auf ihre Luziferaseexpression hin untersucht. Die zu analysierenden Zellen in 12well-Zellkulturplatten werden in 200 µl Lysepuffer lysiert und für fünf Minuten bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. 10 µl des daraus resultierenden Überstands werden dann mit 50 µl der luziferinhaltigen Reporterlösung im Luminometer vermessen.

3.7 Immunisierungen von Versuchstieren

3.7.1 Immunisierungen mit einem 7 Tage-Immunisierungsprotokoll

PV-Präparationen wurden in einer Transfektion in Zellkulturschalen (siehe 3.3.3) produziert und ultrazentrifugiert (siehe 3.3.5) und daraus wurde das PV-Vakzin hergestellt (siehe 3.5). Zur Herstellung monoklonaler Antikörper wurde mit freundlicher Hilfe von H. Zentgraf, Heidelberg, 20 µg (CA) des Env-Vakzins oder, zur Untersuchung des Serums, 10 µg Env-PV im Verhältnis 1:1 mit Freund's komplettem Adjuvans (siehe 2.11) intramuskulär in den *musculus popliteus* (Muskel der Kniekehle) injiziert (*prime*). Eine Genehmigung des Regierungspräsidiums liegt vor. Das Gesamtvolumen von 0,1 ml pro Muskel wird dabei mit einer 0,40 mm (27G)-Kanüle in sechs Wochen alte, weibliche BALB/C-Mäuse injiziert. *Boosts* mit halben Pseudovirionenmenge an Tag vier und sieben erfolgen in PBS unter den gleichen Bedingungen wie bei der *prime*-Immunisierung. An Tag acht werden die Mäuse durch CO₂ getötet, die poplitealen Lymphknoten und die Milzen steril entnommen und Hybridomzellen hergestellt (siehe 3.8).

3.7.2 Immunisierungen mit einem Standard-Immunisierungsprotokoll über zwei Monate

Zur Untersuchung der humoralen Immunantwort und zur Herstellung monoklonaler Antikörper werden in einer Transfektion in Zellkulturschalen (siehe 3.3.3) oder in Zell-

Factories (siehe 3.3.4) gewonnene und aufkonzentrierte Pseudovirionen (siehe 3.3.5 und 3.3.6.1) bzw. daraus hergestellte PV-Vakzine (siehe 3.5) sechs Wochen alten, weiblichen BALB/C-Mäusen injiziert. Im Einzelnen werden 10 µg (CA) CD4/X4-PV oder 20 µg Env-Vakzin bzw. eine Vesikelkontrolle im Verhältnis 1:1 mit Freunds komplettem Adjuvans (siehe 2.11) subkutan in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle injiziert. Die *boosts* erfolgen nach drei und sechs Wochen in Freunds inkomplettem Adjuvans (1:1) (siehe 2.11) mit der halben Menge an Pseudovirionen unter ansonsten gleichen Bedingungen wie bei der *prime*-Immunisierung. Nach zwei Monaten werden ein Teil der Mäuse durch eine zerebrale Dislokation getötet, die Milzen steril entnommen und das Blut aus dem Bauchraum gesammelt. Die anderen Tiere werden, wenn möglichst große Mengen an Blut gewonnen werden sollen, mit einer Sauerstoff/Isofluran-Inhalationsnarkose (3-5% Isofluran) narkotisiert. Das Blut wird durch eine Herzpunktion am nicht geöffneten Herzen mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle entnommen. Die Tiere sterben in Narkose durch Blutverlust.

3.7.3 Immunisierungen mit einer Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein

3.7.3.1 Mäuse

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper werden sechs Wochen alte weibliche BALB/C-Mäuse mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert. Das gp120-Protein stammt vom HIV-1-Stamm IIIB und wurde in Insektenzellen produziert (IIIB^{Baculo}). Das gp41-Protein entspricht dem extrazellulären Bereich des gp41-Proteins vom Stamm HXB-2 und wurde in Hefe produziert. Je 10 µg des gp120- und gp41-Proteins werden im Verhältnis 1:1 mit Freunds komplettem Adjuvans subkutan in einem Gesamtvolumen von 0,5 ml mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle injiziert.

Die eigentlichen Immunisierungen und *boosts* ohne Adjuvans mit je 10 µg Env-Vakzin (CA) erfolgen intraperitoneal drei und fünf Wochen nach der Vorimmunisierung, und ein letzter intravenöser *boost* wird in Woche sieben durchgeführt. Präparationen werden dabei entweder in einem Volumen von 0,5 ml intraperitoneal mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle injiziert (*boost* 1, 2) oder in einem Gesamtvolumen von 0,1 ml mit einer 0,40 mm (27G)-Kanüle langsam intravenös verabreicht (*boost* 3).

Nach weiteren drei Tagen wird den Tieren, wie unter 3.9.1 und 3.8.2 beschrieben, Blut und Milz entnommen.

3.7.3.2 huCD4/huCXCR-4 transgene Ratten

Tab. 3.1: Immunisierungsschema der huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten.

			subkutan, in Freunds komplettem Adjuvans:	nach drei Wochen: intra- peritoneal (ohne Adjuvans):	nach fünf Wochen: intra- peritoneal (ohne Adjuvans):	nach sieben Wochen: intravenös (ohne Adjuvans):	nach weiteren drei Tagen:
Nr.	♀/♂	Name	<i>prime</i>	<i>boost 1</i>	<i>boost 2</i>	<i>boost 3</i>	Tötung
3	♀	*gp120/41 (1)	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	je 10 µg gp120- und gp41- Protein	je 10 µg gp120- und gp41- Protein	je 10 µg gp120- und gp41-Protein	Serum
4	♀	*gp120/41 (2)	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	je 10 µg gp120- und gp41- Protein	je 10 µg gp120- und gp41- Protein	je 10 µg gp120- und gp41-Protein	Serum
5	♀	*Env ^{Fus-} - Vakzin (1)	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - -Vakzin	Milz + Serum
6	♂	*Env ^{Fus-} - Vakzin (2)	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - -Vakzin	Milz + Serum
7	♀	Env ^{Fus-} -Vakzin (1)	60 µg Env ^{Fus-} -Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	Serum
8	♂	Env ^{Fus-} -Vakzin (2)	60 µg Env ^{Fus-} -Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	20 µg Env ^{Fus-} - Vakzin	Serum
9	♂	*Env ^{Fus-} -PV	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	10 µg Env ^{Fus-} - PV	10 µg Env ^{Fus-} - PV	10 µg Env ^{Fus-} - PV	Serum
1	♀	*CD4/X4-PV	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	20 µg CD4/X4- PV	20 µg CD4/X4- PV	20 µg CD4/X4-PV	Serum
2	♂	*PBS	je 30 µg gp120- und gp41-Protein	PBS	PBS	PBS	Serum

*Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper und zur Untersuchung der Virusneutralisationseffizienz der Seren der Tiere werden ca. zwölf Wochen alte weibliche und männliche huCD4/huCXCR-4 transgene Ratten (außer Ratte 3 und 4, die nur für huCD4 transgen waren) immunisiert. Vorimmunisierungen werden mit einem Gemisch von rekombinantem gp120-Protein und einem Protein das dem extrazellulären Bereich des gp41-Proteins entspricht (Stamm HXB-2, produziert in Hefe) vorgenommen. Bei dem gp120-Protein handelt es sich um ein Proteingemisch aus 15% IIIB^{CHO}, 34% LAI^{CHO}, 26% SF^{CHO} und 26% IIIB^{Baculo}. Diese Zusammensetzung ergab sich aus der Tatsache, dass IIIB^{Baculo} bei

vorherigen Immunisierungen nur gering immunogen war und daher eine Mischung von den im Labor vorhandenen gp120-Proteinen aus CHO-Zellen verwendet werden sollte, um so möglicherweise eine höhere Immunantwort zu induzieren. Wie in Tab. 3.1 dargestellt, werden für die Vorimmunisierung pro Ratte je 30 µg gp120- und gp41-Protein im Verhältnis 1:1 mit Freund's komplettem Adjuvans subkutan in einem Gesamtvolumen von 0,8 ml PBS-Lösung mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle injiziert. Ratten, die keine Vorimmunisierung erhalten, werden unter ansonsten gleichen Immunisierungsbedingungen mit 60 µg des Env^{Fus}-Vakzins (CA) (je 30 µg Env^{Fus}- und CD4/X4-PV gemischt (siehe 3.5.2)) immunisiert. Zwei *boosts* in den Wochen drei und fünf nach dem *prime* erfolgen intraperitoneal und der letzte *boost* sieben Wochen nach dem *prime* intravenös. Die in Tab. 3.1 beschriebenen Präparationen werden dabei entweder in insgesamt 1 ml PBS-Lösung (ohne Adjuvans) intraperitoneal mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle injiziert (*boost* 1, 2) oder in einem Gesamtvolumen von 0,3 ml PBS-Lösung (ohne Adjuvans) mit einer 0,40 mm (27G)-Kanüle langsam intravenös verabreicht (*boost* 3).

Nach weiteren drei Tagen wird den Tieren, wie unter 3.9.1 beschrieben, Blut und den Ratten 5 und 6 zusätzlich noch die Milz entnommen (siehe 3.8.2).

3.8 Herstellung monoklonaler Antikörper spezifisch für das HIV-1-Env-Protein

Zur Produktion von monoklonalen Antikörpern werden B-Lymphozyten der Milz oder des Lymphknotens einer immunisierten Maus oder huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratte mit Mausmyelomzellen (Tumorzellen eines B-Lymphozyten) fusioniert. So entstehen Hybridzellen, die sich unbegrenzt vermehren können.

Dafür wird die Zelllinie SP2/0-Ag 14 (kurz SP2/0) verwendet. Diese Myelomzellen synthetisieren selbst keine Immunglobulinketten und weisen einen Defekt der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribyl-Transferase (HGPRT) auf, welche die Synthese einer gemeinsamen Vorstufe von AMP und GMP aus Hypoxanthin katalysiert. Dieser Defekt greift in den Reservestoffwechselprozess der Nukleinsäuresynthese der Zellen ein. Der Nukleinsäurestoffwechsel ist allerdings noch über den Hauptsyntheseweg möglich. SP2/0-Zellen können sich nicht in einem Medium vermehren, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (HAT-Medium), weil der Hauptsyntheseweg durch Aminopterin versperrt ist und der Reservestoffwechsel durch das Fehlen des Enzyms HGPRT nicht funktioniert. Lymphozyten der Milz und des Lymphknotens immunisierter Versuchstiere sind in diesem Medium ebenfalls nicht lange wachstumsfähig. Die einzigen Zellen, die sich in dem HAT-Selektionsmedium teilen und vermehren können, sind Fusionszellen.

3.8.1 Gewinnung von *Feeder*-Zellen

Zur Förderung des Wachstums der Hybridome nach der Zellfusion von Lymphozyten der Maus- oder Rattenmilz oder von Lymphozyten der Lymphknoten der Maus mit den SP2/0-Zellen (siehe 3.8.3), oder des Wachstums der Hybridomzellklone nach der Subklonierung (siehe 3.8.4), werden dem HAT-Medium (siehe 2.12) Milzzellen einer BALB/C-Maus zugegeben. Diese Zellen sezernieren Wachstumsfaktoren, die das Überleben der Hybridome fördern sollen.

Nachdem die Maus durch eine zerebrale Dislokation getötet wurde, wird das Fell mit 70%igem Ethanol übergossen und dadurch sterilisiert. Die Bauchdecke wird an der linken Flanke unter sterilen Bedingungen geöffnet und die Milz entnommen. Anschließend wird die Milz auf ein Metallnetz in einer Petrischale mit 5 ml vorgewärmtem RPMI-Medium gelegt und das Organ mit Hilfe eines Spritzenstempels durch das Gitter gepresst. Dadurch werden die Milzparenchymzellen vereinzelt und grobe Bindegewebsstränge abgegrenzt. Das Gitter wird mit weiteren 5 ml warmem RPMI-Medium gewaschen, die zu den ersten 5 ml dazugegeben werden. Die Suspension wird bei 1.500 rpm für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und die Zellen in 10 ml RPMI-Medium gewaschen. Dieser Schritt wird zweimal wiederholt. Anschließend werden die *Feeder*-Zellen in 20 ml HAT-Medium (siehe 2.12) resuspendiert. Dabei wird je eine Milz für jeweils 15 der für die Zellfusion oder die Subklonierung benötigten 96well-Zellkulturplatten eingesetzt.

3.8.2 Gewinnung von B-Lymphozyten aus immunisierten Versuchstieren

Die Entnahme und Vereinzelung einer Maus- oder Rattenmilz erfolgt wie unter 3.8.1 beschrieben, und die Entnahme der poplitealen Lymphknoten erfolgt aus den Kniekehlen.

3.8.3 Lymphknoten- und Milzfusion mit Myelomzellen

Lösungen und Materialien:

HAT-Medium: 15% FCS (*Gibco BRL*, Karlsruhe)
 240 µM Mercaptoethanol (0,1 M Stammlösung zuvor steril filtrieren)
 10 ml 50 x HAT-Mediumzusatz (*Sigma*, Deisenhofen)
 Penicillin/Streptomycin 1%, (*Gibco BRL*, Karlsruhe)
 in 500 ml RPMI-Medium

Waschmedium: RPMI-Medium

PEG: 50%ige Polyethylenglykollösung (PEG), PEG 1500 (*Sigma*,
Deisenhofen)

3 x 5 cm Edelstahlnetze DKFZ, Heidelberg
(0,5 mm Maschenweite)

Für die Fusion der B-Lymphozyten einer Mausmilz oder der beiden Lymphknoten der Beine der Maus werden 1×10^8 SP2/0-Zellen und für die Fusion mit den B-Lymphozyten einer Rattenmilz 3×10^8 SP2/0-Zellen verwendet. Um am Tag der Fusion genügend Zellen zur Verfügung zu haben, wird die Kultur drei Tage zuvor auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 200 ml (Mausmilz oder Lymphknoten) bzw. 600 ml (Rattenmilz) RPMI^k-Medium eingestellt.

Die immunisierten Versuchstiere werden durch eine zerebrale Dislokation getötet, die Milz wird wie unter 3.8.1 beschrieben entnommen und ihre Zellen vereinzelt. Die Zellen werden in 10 ml 37°C warmem Waschmedium aufgenommen und bei 1.500 rpm für zehn Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Milzzellsuspension wird dann noch zweimal mit Waschmedium gewaschen. Die SP2/0-Zellen werden ebenfalls dreimal in 37°C warmem Waschmedium gewaschen. Beim letzten Waschschrift werden die beiden Zellarten in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vereint, wie oben zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Für die Fusion der Zellen wird 37°C warmes 50%iges Polyethylenglykol (PEG) 1500 verwendet. 1,5 ml PEG werden langsam (über 90 Sekunden) auf das SP2/0-Lymphozyten-Gemisch getropft, während die Zellsuspension vorsichtig mit einer zugeschweißten Pasteurpipette gerührt wird. Nach weiteren 60 Sekunden werden innerhalb von vier Minuten langsam 20 ml Waschmedium hinzupipettiert: 1 ml in der ersten, weitere 3 ml in der zweiten und die restlichen 16 ml nach weiteren zwei Minuten. Danach werden die Zellen erneut wie oben beschrieben zehn Minuten lang zentrifugiert und anschließend fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in HAT-Medium resuspendiert. Die aus jeder Milz gewonnenen *Feeder*-Zellen (siehe 3.8.1) werden für jeweils 15 96well-Platten verwendet. Die Zellsuspension wird in 10-15 96well-Zellkulturplatten mit flachem Boden (pro Mausmilz oder pro zwei Lymphknoten) bzw. in 30 96well-Zellkulturplatten (pro Rattenmilz) in Volumen von 200 µl pro Vertiefung ausplattiert. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C und 5% CO₂. Täglich werden die Hybridome auf ihr Wachstum und eventuelle Kontaminationen untersucht. Die Analyse der Zellkulturüberstände auf eine eventuelle Produktion der gewünschten Antikörper erfolgt sieben bis neun Tage nach der Zellfusion.

3.8.4 Subklonierung und anschließende Expandierung von Hybridomzellen

Die Präsenz von gp120- oder gp41-Antikörpern in Überständen der Hybridomzellkulturen wird mittels eines ELISAs (siehe 3.6.9) untersucht. Antikörper produzierende Hybridomzellklone werden nachfolgend in 1,6 ml HAT-Kulturmedium resuspendiert (Ursprungs-*well* als Reserve wieder mit 150 µl HAT-Medium auffüllen) und jeweils 200 µl davon in die *wells* der ersten Spalte einer 96*well* Platte transferiert. In die restlichen *wells* (Spalte 2-12) der Platte werden 100 µl einer *Feeder*-Zellsuspension (siehe 3.8.1) vorgelegt. 100 µl der Hybridomzellsuspension der Spalte 1 werden dann durch die *wells* der Spalten 2-12 passagiert, wodurch jeweils eine partielle Verdünnung der Hybridomzellklone von 1:2 entsteht. Durch diese Verdünnung wird erreicht, dass sich in den höchsten Verdünnungsstufen nur noch einzelne Zellen befinden, die dann Einzelklone bilden. Der Überstand der Kulturen wird sieben bis neun Tage später erneut auf das Vorhandensein von gp120- oder gp41-Antikörpern mittels eines ELISAs untersucht. Positive Kulturen, die aus Einzelklonen hochgewachsen sind, werden erneut subkloniert. Anschließend erfolgt die Expandierung der positiven Klone, welche zu diesem Zweck in größere Zellkulturflaschen transferiert und in RPMI^k-Medium (ohne HAT-Zusatz) kultiviert werden.

3.8.5 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Protein-G-Sepharose-beads

Die Antikörper aus dem Zellkulturüberstand von Hybridomzellen werden mittels Protein-G-Sepharose-*beads* affinitätsaufgereinigt. Dazu werden *gammabind* G Typ 3-*beads* (siehe 2.11) verwendet, eine an Sepharose-Kügelchen (*beads*) gekoppelte, rekombinante Form des Proteins G aus Streptokokken, welches den Fc-Teil von Immunglobulinen verschiedener Spezies erkennt.

1 ml Zellkulturüberstand werden jeweils 40 µg (20 µl) Protein-G-Sepharose-*beads* zugegeben und über Nacht unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in je 1 ml PBS mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 Sekunden werden die Sepharose-*beads* in 20 µl 2 x SB-Puffer (siehe 2.12) aufgenommen, 10 Minuten gekocht und die antikörperfreien *beads* bei 13.000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wird mittels SDS-PAGE (siehe 3.6.3) elektrophoretisch aufgetrennt, und das Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt und analysiert (siehe 3.6.4).

3.9 Gewinnung und Charakterisierung von Antikörpern aus Versuchstierblut

3.9.1 Gewinnung von Serum aus dem Blut immunisierter Versuchstiere

Von Mäusen oder huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten wird auf verschiedene Weise Blut gewonnen. Für den Fall, dass die Tiere nach dem Eingriff weiterleben sollen, wird 1. den Tieren nach einer Sauerstoff/Isofluran-Inhalationsnarkose (3-5% Isofluran) durch eine Retrobulbärpunktion mit einer Glaskappillare am nasalen Augenwinkel oder 2. durch das Kappen der Schwanzspitze mit einem Skalpell (bei der Ratte nach einem CO₂-*knockout*) eine geringe Menge Blut abgenommen. Wenn die Tiere den Eingriff nicht überleben müssen, wird eine Herzpunktion 3. ohne vorheriges Öffnen des Brustraums während einer Sauerstoff/Isofluran-Inhalationsnarkose oder 4. nach vorherigem Öffnen des Brustraumes nach einer intraperitonealen Ketamin (115 mg/kg) / Rompun (1 mg/kg)-Injektion durchgeführt, und mit einer 0,60 mm (23G)-Kanüle lateral zwischen den Rippen bzw. im rechten Ventrikel des Herzens das maximal entnehmbare Volumen gesammelt. Das entspricht bei der Maus bis 800 µl und bei der Ratte bis 8 ml Blut.

Das so gewonnene Blut wird 30 Minuten bei Raumtemperatur und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor es bei 3.500 rpm für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert wird, wobei sich das Serum als gelblicher Überstand abscheidet.

3.9.2 Affinitätsaufreinigung von Antikörpern mittels Protein-G-Sepharose-Säule

Lösungen und Materialien:

Protein G: Protein-G-Sepharose-*beads gammabind* G Typ 3 (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden)

Elutionspuffer: 0,1 M Glycin in PBS, pH 3.0

TRIS-Puffer: 1 M TRIS-HCl, pH 8.0

Waschpuffer: 1 M Essigsäure, pH 2.5

20%iges Ethanol

Dialyseschlauch

Antikörper aus Seren und, zur Kontrolle, monoklonale Antikörper aus Zellkulturüberständen werden mittels einer Protein-G-Sepharose-Säule affinitätsaufgereinigt. In einer 15 ml Econo-Glassäule werden 1,5 mg (= 750 µl) Protein G-*beads* eingebracht und mit 250 ml PBS gespült. Anschließend werden entweder 20 ml Hybridomzellüberstand oder 0,5 ml Serum,

verdünnt mit PBS auf 20 ml Endvolumen, bei Raumtemperatur über die Säule laufen gelassen. Der Säulendurchfluss wird aufgefangen und erneut bei Raumtemperatur auf die Säule gegeben. Nach einem anschließenden Waschschrift mit 50 ml PBS werden die gebundenen Antikörper mit einer Glycinlösung (0,1 M, pH 3.0) in Fraktionen zu 1 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße eluiert, in welche 50 µl 1 M TRIS-HCl-Lösung, pH 8.0, vorgelegt wurde. Der gewünschte pH-Wert der IgG-Fraktionen von 7.0 wird mit einem Indikatorpapier überprüft. Die Fraktionen werden auf Vorhandensein und Größe von Proteinen, die in ihrem Molekulargewicht Immunglobulinen entsprechen, mittels SDS-PAGE (siehe 3.6.3) und Coomassie-Blau-Färbung (siehe 3.6.4) untersucht. Die Fraktionen, die Antikörper enthalten (Fraktionen 2-4), werden vereint und über Nacht bei 4°C gegen 500 ml PBS dialysiert, und anschließend wird das Dialysat ultrafiltriert (siehe 3.9.3).

Die Säule wird für weitere Aufreinigungen vorbereitet, indem mit 30 ml 1 M Essigsäure, pH 2.5, sämtliche, möglicherweise noch bindende Antikörper von der Säule entfernt werden. Nach einem Waschschrift mit 50 ml PBS wird die Säule mit 20%igem Ethanol gespült und darin bis zur nächsten Immunglobulinaufreinigung aufbewahrt.

3.9.3 Ultrafiltrationsaufreinigung affinitätsaufgereinigter Antikörper

Um die wie unter 3.9.2 beschrieben hergestellten affinitätsaufgereinigten IgG-Fraktionen zu filtrieren, werden jeweils 0,5 ml der IgG-Fraktionen in 20 ml PBS aufgenommen, in einem *Vivascience*-Ultrafiltrationsröhrchen (siehe 2.15) bei 5.000 rpm für ca. zehn Minuten zentrifugiert, und so auf ein Volumen von 200 µl konzentriert. Das Konzentrat wird unter Spülen der Filtermembran entnommen und kurzfristig bei 4°C und langfristig bei -70°C gelagert.

4 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung einer PV-Vakzinierungsstrategie gegen HIV-1. Dabei konzentrierte sich die Untersuchung auf die folgende Fragestellung: Können durch eine Immunisierung in Mäusen und Ratten Antikörper induziert werden, die eine Neutralisation beziehungsweise eine Kreuzneutralisation verschiedener HIV-1-Labor- und/oder Primärisolate zeigen?

Bis heute gibt es kein effizientes, auf Antikörpern oder auf einer T-Zell-Antwort basierendes HIV-Vakzin. Die hier verwendete Strategie war darauf ausgerichtet, intermediäre konformationelle Epitope des HIV-1-Env-Glykoproteins, die durch die Interaktion mit dessen Rezeptor und Korezeptor (CD4 und CXCR-4) hervorgerufen werden, anzureichern und als Vakzin zu verwenden. Dazu wurden virusähnliche Partikel, hier Pseudovirionen (PV) genannt, mit eingebautem HIV-1-Env (Env-PV) und Pseudovirionen mit eingebautem Rezeptor und Korezeptor, CD4 und CXCR-4, (CD4/X4-PV), gemischt und die durch die resultierende Partikelfusion induzierten, neuen Env-Konformationen entweder chemisch (Env^{WT}) oder genetisch (Env^{Fus-}) (siehe 3.5) fixiert. Im ersten Fall wurde ein HIV-1-Wt-Env-Expressionskonstrukt (Env^{WT}) verwendet. Dieses Glykoprotein ist fähig, nach Interaktion mit CD4 und CXCR-4 Membranfusion zu vermitteln und dabei neue konformationelle Strukturen anzunehmen. Ohne eine chemische Fixierung des Fusionsprozesses werden neue Konformationen von Wt-HIV-1-Env ausschließlich transient präsentiert. Durch die chemische Behandlung mit Glutaraldehyd (GA) werden diese Epitope jedoch fixiert. Als Alternative zur chemischen Fixierung wurde auch ein in Env mutiertes Konstrukt verwendet. In diesem Fall spricht man von einer genetischen Fixierung. Mit Hilfe dieser genetischen Fixierung soll eine bestimmte Konformation innerhalb der Kaskade von Rezeptor-induzierten Konformationsänderungen angereichert und fixiert werden. In dieser Arbeit wurde ein HIV-1-Env-Glykoprotein mit einer Mutation im Fusionspeptid (FP) in gp41 verwendet (Env^{Fus-}) (Freed *et al.*, 1990). Dieses Glykoprotein vermittelt keine Membranfusion nach Interaktion mit CD4 und CXCR-4, kann allerdings neue konformationelle Epitope innerhalb der Kaskade der CD4/X4-bindungsinduzierten konformationellen Änderungen präsentieren.

Neben der Analyse der Immunantwort der immunisierten Tiere ist ein weiterer Schwerpunkt die Untersuchung der PV-Produktion und -zusammensetzung.

4.1 Expressionskonstrukte

4.1.1 Konstrukte zur PV-Produktion

Am Anfang der Arbeit wurden zwei provirale Verpackungskonstrukte eingesetzt, nämlich pNL4-3-Luc.RE⁻ (He *et al.*, 1995), im Folgenden pNL4-3-LuziΔRΔEnv genannt, und pNL4-3-ΔΨΔEnv (siehe Abb. 4.1, A). Diese beiden Konstrukte exprimieren ca. die fünffache Menge HIV-1-PV (CA) als das zuvor verwendete, nicht provirale partikelexprimierende Konstrukt pKexHIVΔEnv. Außerdem ermöglicht pNL4-3-LuziΔRΔEnv durch die Kodierung der *Firefly*-Luziferase anstelle von *nef* den Nachweis der interretroviralen Fusion mit Hilfe des Luziferase-Assays (siehe 3.4.1). In der zweiten Hälfte der Arbeit wurde uns von B. Müller, Universität Heidelberg, das subvirale Konstrukt pcDNA-HIVΔEnv zur Verfügung gestellt. Dieses Plasmid zeigte eine vergleichbare PV-Produktion wie die proviralen Konstrukte. Außerdem ist es bei einer eventuellen Entwicklung der hier untersuchten Vakzinierungsstrategie über das experimentelle Stadium hinaus von Vorteil, nicht provirale Konstrukte, die in abgeänderter Form der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet werden können, zu verwenden.

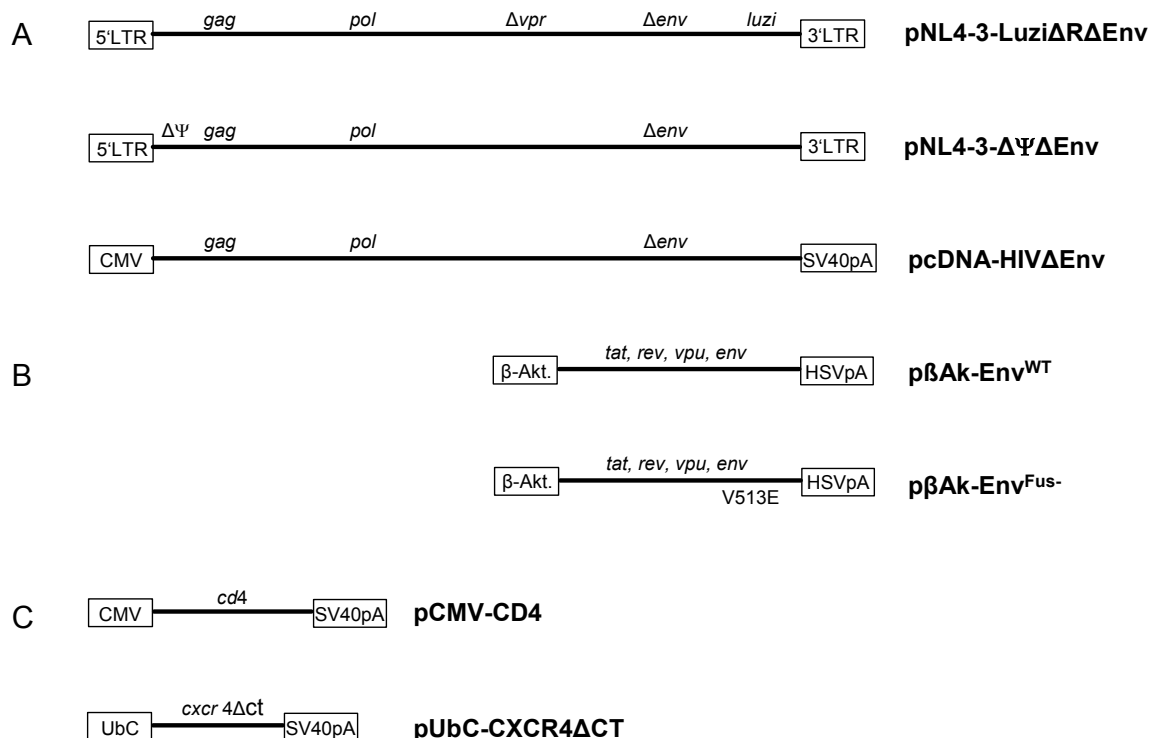


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der verwendeten Expressionsplasmide.

(A) Verpackungskonstrukte (B) Expressionskonstrukte für HIV-1-Env^{WT} und HIV-1-Env^{Fus-} (C) Expressionskonstrukte für CD4 und CXCR-4. Rechtecke symbolisieren Promotor- und PolyA-Sequenzen. Siehe auch 2.7.1.

LTR = *long terminal repeat*, CMV = *cytomegalovirus-immediate-early*-Promotor, SV40pA = *Simian Virus* 40-Polyadenylierungssequenz, HSVpA = *Herpes simplex virus* Thymidin-Kinase-Polyadenylierungssequenz, UbC = Ubiquitin C-Promotor.

4.1.2 Env-Expressionskonstrukte

Um das geeignetste Konstrukt hinsichtlich Expressionsstärke und Einbau in Pseudovirionen zu bestimmen, wurden zunächst verschiedene Expressionsplasmide für Wt oder mut. HIV-1-Env-Glykoproteine im Bezug auf diese Eigenschaften in Western-Blot-Analysen untersucht und miteinander verglichen. (Daten nicht gezeigt). Dabei erwiesen sich p β Ak-Env^{WT} (Kräusslich *et al.*, 1993) für die Expression eines BH10-Wildtyp-Env-Proteins und p β Ak-Env^{Fus-} für die Expression der BH10-Fusionspeptidmutante (Freed *et al.*, 1990) (siehe Abb. 4.1, B) als am besten geeignet. Sowohl das Expressionsniveau als auch der Einbau in Pseudovirionen war mit diesen beiden Expressionskonstrukten mit am höchsten. Außerdem ist gereinigtes, rekombinantes gp120- bzw. gp41-Protein des Stammes IIIB bzw. HXB-2 kommerziell erhältlich. Sie unterscheiden sich in nur wenigen Aminosäurepositionen vom Stamm BH10. Deshalb konnten diese rekombinanten Proteine im Env-ELISA (siehe 3.6.9) und bei Vorimmunisierungen mit Env-Proteinen in einem optimierten Immunisierungsexperiment (siehe 3.7.3) verwendet werden.

4.1.3 CD4- und CXCR-4-Expressionskonstrukte

Als CD4-Expressionskonstrukt wurde pCMV-CD4 (Krüger *et al.*, 1996) und als CXCR-4-Expressionskonstrukt pUbC-CXCR-4 Δ CT mit einer C-terminalen Deletion in CXCR-4 (Signoret *et al.*, 1997) verwendet (siehe Abb. 4.1, C). Das im Rahmen dieser Arbeit klonierte Konstrukt pcDNA-X4-IRES-CD4 (siehe 6.2), welches sowohl CXCR-4 und CD4, getrennt durch eine IRES (*internal ribosomal entry site*), auf einem Plasmid exprimiert, wurde nicht weiter verwendet, da die Expression von CD4 zu gering war. Dies war der Fall, obwohl nachgewiesen wurde, dass die IRES funktionsfähig war.

4.2 Membranfusion zwischen Env^{WT}-PV und CD4/X4-PV

Der Nachweis der Fusion zwischen Pseudovirionen mit eingebautem HIV-1-Env^{WT} (Env^{WT}-PV) und Pseudovirionen mit eingebauten HIV-1-Rezeptoren, CD4 und CXCR-4, (CD4/X4-PV) (Sparacio *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2001) bildete die Grundlage der hier untersuchten Vakzinierungsstrategie. Deshalb wurde mit ersten PV-Präparationen diese Beobachtung nochmals überprüft.

Die entsprechenden Pseudovirionen wurden durch Kotransfektionen in 293T-Zellen hergestellt (siehe 3.3.3) und in einem CA-ELISA (siehe 3.6.8) quantifiziert. Die jeweiligen Pseudovirionen oder PV-Gemische wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert, bevor sie auf CD4- und CXCR-4-exprimierende Zielzellen gegeben wurden (siehe 3.4.1). Drei Tage nach Transduktion wurde die Luziferaseaktivität der Zelllysate bestimmt (siehe 3.6.11).

Die Strategie zur Untersuchung der interretroviralen Fusion ist in Abb. 4.2 dargestellt.

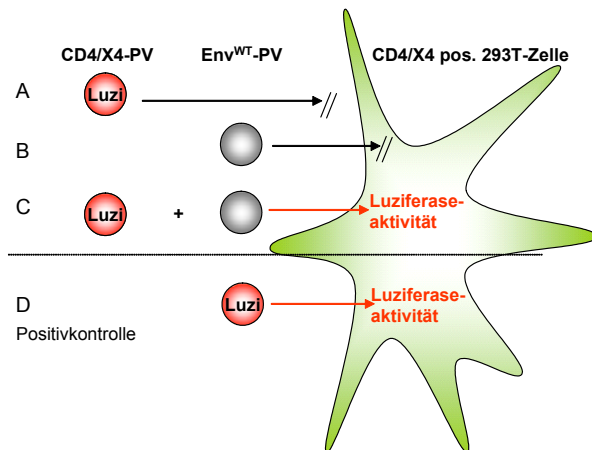


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Versuchs zur Untersuchung der Env-vermittelten Membranfusion von Pseudovirionen.

Detaillierte Erläuterungen im Text.

CD4/X4-PV wurden von einer proviralen DNA exprimiert (pNL4-3-Luzi Δ R Δ Env), die auch für ein Luziferasegen kodiert (PV mit Luziferasegen rot dargestellt). CD4- und CXCR-4-exprimierende Zellen können von diesen mit CD4 und CXCR-4 pseudotypisierten Pseudovirionen allein nicht transduziert werden (siehe Abb. 4.2, A).

Env^{WT}-PV, die nicht für das Luziferasegen kodieren (PV grau dargestellt), wurden von pNL4-3- Δ Ψ Δ Env exprimiert und haben das HIV-Env^{WT}-Protein in ihre Lipidschicht eingebaut. Sie sind zwar fähig, allein, d.h. ohne vorherige Fusion mit CD4/X4-PV, in Zielzellen einzudringen, können jedoch keine Luziferaseaktivität transduzieren (siehe Abb. 4.2, B).

Wurden die jeweiligen Env^{WT}- bzw. CD4/X4-PV vor der Infektion gemischt (siehe Abb. 4.2, C), stellt sich die Frage, ob die resultierenden Strukturen in der Lage sind, Luziferaseaktivität in die CD4/X4-exprimierenden 293T-Zielzellen zu transduzieren.

Als Positivkontrolle wurden Pseudovirionen mit inkorporiertem Env^{WT} (Env^{WT}-PV (Luzi⁺)) verwendet, die für das Luziferasegen kodieren (siehe Abb. 4.2, D). Sie transduzieren direkt, also ohne vorherige interretrovirale Fusion, CD4/CXCR-4-positive Zielzellen. Die transduzierte Luziferaseaktivität dieser Präparationen wurde auf 100% gesetzt. Die restlichen Luziferasewerte wurden relativ dazu berechnet.

4.2.1 Pseudovirionen in Zellkulturüberständen

Die Ergebnisse eines in Abb. 4.2 beschriebenen repräsentativen Experiments sind in Abb. 4.3 grafisch dargestellt.

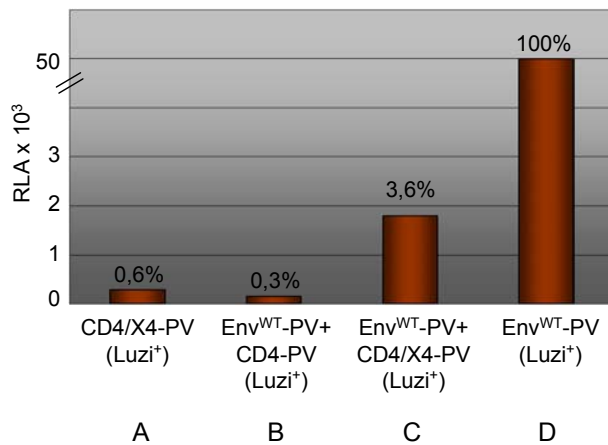


Abb. 4.3: Luziferasegentransduktion nach der intervirealen Membranfusion von Env^{WT}-PV mit CD4/X4-PV.

Dargestellt sind die Luziferaseaktivitäten von Lysaten von CD4/CXCR-4-positiven 293T-Zellen, drei Tage nach Infektion durch die auf der x-Achse angegebenen Pseudovirionen bzw. PV-Gemische. 100% entsprechen denjenigen Luziferaseaktivitäten, die erhalten werden, wenn das Luziferasereporter-gen direkt von Env^{WT}-PV (Env-PV (Luzi⁺)) transduziert wird. Die Präparationen, die hier mit A-D zugeordnet werden, sind auch in Abb. 4.2 mit A-D beschrieben (mit einer Variation in B, siehe Text). RLA = Relative Luziferaseaktivität.

Lysate von Zellen, die ausschließlich mit CD4/X4-PV (Luzi⁺) behandelt wurden (siehe Abb. 4.3, A), zeigen lediglich eine Hintergrund-Luziferaseaktivität von 0,6% der Positivkontrolle.

Als weitere Negativkontrolle wurden CD4-PV (Luzi⁺) (ohne CXCR-4) mit Env^{WT}-PV (Luzi⁻) gemischt (siehe Abb. 4.3, B). In diesem Fall betrug die Luziferaseaktivität der transduzierten Zellen nur 0,3%. Wenn jedoch CD4/X4-PV (Luzi⁺) mit Env^{WT}-PV (Luzi⁻) gemischt und inkubiert wurden, konnte das Gemisch mit 3,6% signifikant Luziferaseaktivität in CD4/X4-exprimierende 293T-Zellen transduzieren (siehe Abb. 4.3, C). In zahlreichen Experimenten dieser Art ermittelte man Transduktionseffizienzen der fusionierten Strukturen, die 1,5-4,0% der Positivkontrolle betrugen.

4.2.2 Einfluss von Aufreinigung und Lagerung der Pseudovirionen auf ihre Funktionalität

Aufgrund der Tatsache, dass nur relativ kleine Volumen für Vakzinierungen verwendet werden können und die produzierten Pseudovirionen nicht sofort zur Vakzinierung verwendet werden sollten, war es notwendig zu testen, ob die PV-Funktionalität und die interretrovirale Fusion durch die PV-Konzentration und -Lagerung beeinflusst werden. Einerseits wäre es denkbar, dass die Konzentration und die Lagerung der Pseudovirionen ihre Funktionalität

vermindern könnten, andererseits wäre es auch denkbar, dass die interretrovirale Fusion mit konzentrierten Pseudovirionen effizienter ist.

Im folgenden Experiment wurde nun der Einfluss der Konzentration der Pseudovirionen durch Ultrazentrifugation und der Lagerung der Pseudovirionen bei -70°C auf die Infektiosität sowie auf die interretrovirale Fusion untersucht. Die Analyse der Infektiosität (siehe Abb. 4.4, A) wurde mit Env^{WT}-PV (Luzi⁺) direkt durchgeführt, während die interretrovirale Fusion (siehe Abb. 4.4, B) unter Verwendung von CD4/X4-PV (Luzi⁺), in einem Gemisch mit Env^{WT}-PV, untersucht wurde (siehe Abb. 4.2).

Vor der Infektion bzw. interretroviralen Fusion wurden die Pseudovirionen unterschiedlich behandelt. Ein Teil des filtrierten Zellkulturüberstands wurde bei -70°C eingefroren und der andere Teil bei 4°C gelagert. Außerdem wurden die enthaltenen Pseudovirionen durch ein Saccharosekissen ultrazentrifugiert und der dabei erhaltene PV-Niederschlag in PBS resuspendiert. Ein Teil dieses Niederschlags wurde ebenfalls bei -70°C eingefroren und der Rest bei 4°C gelagert. Die Lagerung bei 4°C oder -70°C erfolgte jeweils für wenige Stunden. Dann erfolgte die Infektion von CD4/Korezeptor exprimierenden 293T-Zellen. Lysate der Zielzellen wurden auf ihre Luziferaseaktivität getestet und die erhaltenen Ergebnisse in Abb. 4.4 grafisch dargestellt.

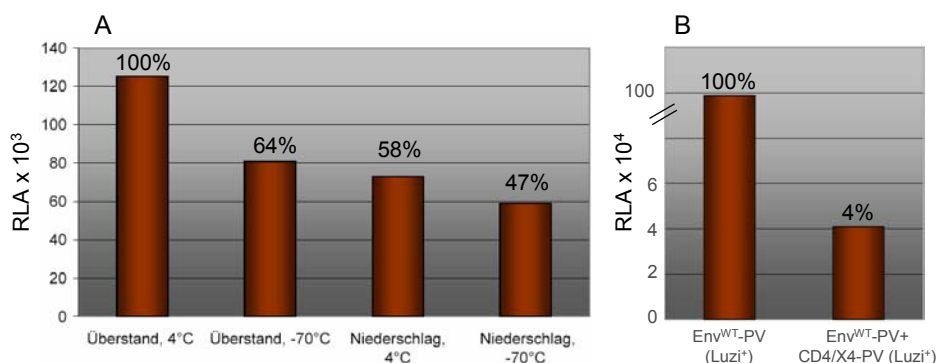


Abb. 4.4: Einfluss von Aufreinigung und Lagerung der Pseudovirionen auf die Infektiosität und interretrovirale Membranfusion.

(A) Infektiosität von Env^{WT}-PV: Dargestellt sind die Luziferaseaktivitäten von Lysaten von CD4/Korezeptor-positiven 293T-Zellen nach der Infektion mit den auf der x-Achse angegebenen PV-Präparationen, die bei 4°C bzw. bei -70°C gelagert wurden, und ultrazentrifugiert (Niederschlag) oder nicht ultrazentrifugiert (Überstand) wurden. (B) Interretrovirale Membranfusion: Dargestellt sind die Luziferaseaktivitäten von Lysaten von CD4/Korezeptor-positiven 293T-Zellen nach der Infektion der auf der x-Achse angegebenen Pseudovirionen bzw. PV-Mischungen (siehe auch Abb. 4.2). RLA = Relative Luziferaseaktivität.

Wie in Abb. 4.4, A dargestellt, kam es sowohl durch das Einfrieren von PV-Zellkulturüberstand wie auch durch die Ultrazentrifugation zu einem signifikanten Verlust an Infektiosität von ca. 40%, der bei einer Kombination beider Verfahren auf ca. 50% anstieg.

Das Ausmaß der interretroviralen Fusion (4% Luziferasetransduktion im Vergleich zur Positivkontrolle) (siehe Abb. 4.4, B) lag in derselben Größenordnung wie ohne Ultrazentrifugation und Einfrieren (siehe Abb. 4.3).

Es kann also davon ausgegangen werden, dass mit konzentrierten und bei -70°C gelagerten Pseudovirionen weiterhin intermediäre konformationelle Epitope des HIV-1-Env-Glykoproteins hervorgerufen und angereichert werden können.

4.2.3 Fusionskinetik von Pseudovirionen in Zellkulturüberständen

Neben der Strategie der genetischen Fixierung (siehe 3.5.2) war auch eine Fixierung der PV-Gemische mit HIV-Env^{WT} durch eine chemische Behandlung mit Glutaraldehyd in einer intermediären Env-Konformation vorgesehen (siehe 3.5.1). Dafür war es wichtig zu wissen, wie lange die Fusion der Pseudovirionen andauert, um zu den entsprechenden Zeiten die Chemikalie dazugeben zu können. Die Strategie des Experiments ist in Abb. 4.5 schematisch dargestellt.

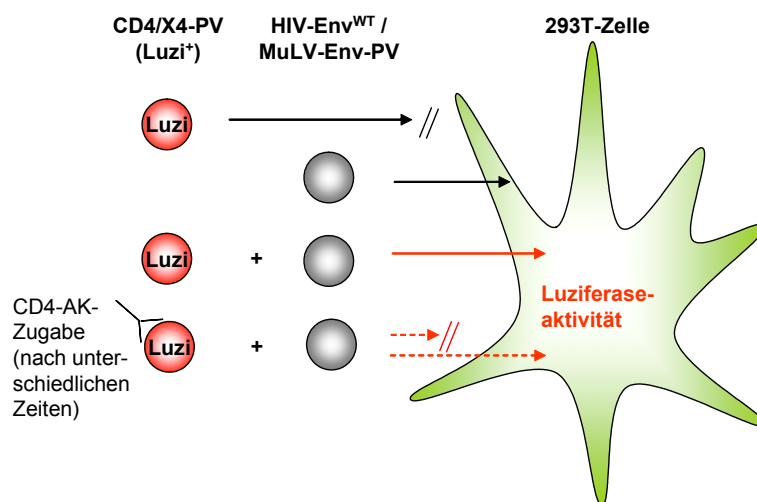


Abb. 4.5: Schematische Darstellung des Versuchs zur Untersuchung der Kinetik miteinander fusionierender CD4/X4- und HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV.

Detaillierte Erläuterungen sind im Text sowie unter 3.4.2 zu finden.

Die eingesetzten CD4/X4-PV kodierten für das Luziferasegen (CD4/X4-PV (Luzi⁺)). Die zweite PV-Präparation (HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV) bestand aus Pseudovirionen ohne Luziferasegen mit eingebautem HIV-Env^{WT} und mit einem zusätzlichen, speziell für dieses Experiment eingebauten, MuLV-Env-Protein. Bei dem Env-Glykoprotein des Murinen Leukämievirus handelt es sich um ein Molekül, welches durch die Interaktion mit seinem in Zellen weit verbreiteten zellulären Rezeptor PIT2 die Fusion mit der Zielmembran induziert. Der experimentelle Hintergrund dieses Versuchs ergibt sich erneut aus der Tatsache, dass ausschließlich fusionierte PV-Strukturen in der Lage sind, Luziferaseaktivität in die Zielzellen zu transduzieren. Der für die Transduktion erforderliche Eintritt in die Zelle wird nun allerdings nicht wie bei dem unter 4.2.1 durchgeführten Versuchen durch HIV-Env selbst, sondern durch MuLV-Env vermittelt. Das ermöglicht die Beendigung der PV-Fusion mit CD4-Antikörpern (Sim2/Sim4; monoklonaler, neutralisierender Antikörper gegen CD4) bei einer

weiterhin funktionellen Transduktionseigenschaft der fusionierten Pseudovirionen über das MuLV-Env-Protein.

Eine Mischung gleicher CA-Mengen der auf 37°C erwärmten Zellkulturüberstände von CD4/X4- und HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV wurde auf vier verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt. Im ersten Ansatz waren bereits CD4-Antikörper vorgelegt, wodurch eine Fusion der beiden PV-Arten aufgrund der Bindung an CD4 von vornherein unmöglich wurde. Jeweils nach 20, 40 bzw. 60 Minuten bei 37°C wurde den verbleibenden drei Reaktionsgemischen ebenfalls CD4-Antikörper zugegeben, was eine Beendigung der PV-Fusion zu definierten Zeitpunkten ermöglichen sollte. Demzufolge müsste bei der Infektion von 293T-Zellen eine zeitabhängige Transduktion der Luziferaseaktivität nachweisbar sein. Nach der Infektion wurden die Zelllysate auf ihre Luziferaseaktivität hin getestet.

Wie in Abb. 4.6 dargestellt, ist nach 40 Minuten ein Maximum an Luziferasetransduktion erreicht. Das bedeutet, dass die Fusion zwischen Env^{WT}-PV und CD4/X4-PV nach dieser Zeit beendet ist. Entsprechend den Erwartungen wird die PV-Fusion zum Zeitpunkt null gänzlich unterdrückt, während sich nach 20 Minuten ca. 50% der möglichen PV-Fusionen ereignet haben.

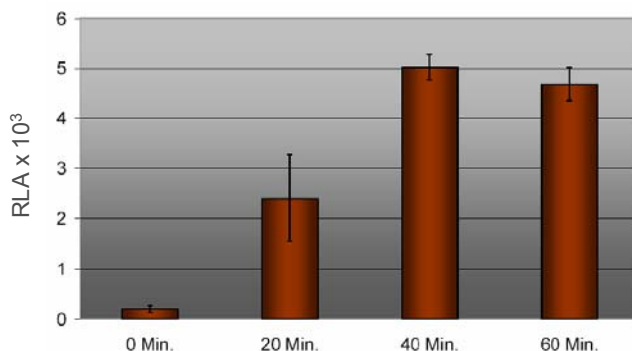


Abb. 4.6: Kinetik miteinander fusionierender CD4/X4- und HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV.

Dargestellt sind die Luziferaseaktivitäten von 293T-Zelllysaten drei Tage nach der Infektion mit einem CD4/X4-PV-HIV-Env^{WT}/MuLV-Env-PV-Gemisch, dem nach den angegebenen Inkubationszeiten CD4-Antikörper zugegeben, und somit die PV-Fusion gestoppt wurde. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert der erhaltenen Daten aus zwei Experimenten dar; der Fehlerbalken ergibt sich aus der Standardabweichung der Werte. RLA = Relative Luziferaseaktivität.

Außer den oben beschriebenen Untersuchungen wurden auch Kontrollen durchgeführt (Daten grafisch nicht dargestellt). So wurde anstelle des CD4-Antikörpers ein irrelevanter monoklonaler Antikörper (EGFR) (Waterfield *et al.*, 1982) nach den jeweiligen Inkubationszeiten (0, 20, 40, 60 Minuten) zugegeben oder das PV-Gemisch 80 Minuten ohne Zugabe von Antikörpern inkubiert und zur Infektion verwendet. Setzt man die Luziferasewerte der Zelllysate des PV-Gemischs ohne Antikörperzugabe auf 100%, kann man feststellen, dass alle mit EGFR-Antikörpern inkubierten PV-Gemische vergleichbare Luziferaseaktivitäten vermittelten. Allerdings erreichten die mit CD4-Antikörpern abgestoppten PV-Fusionsansätze in keinem Fall diese 100%, sondern das Plateau lag bei

ca. 30%. Diese Beobachtung konnte nicht endgültig geklärt werden. Es ist aber denkbar, dass CD4-Antikörper, welche an die fusionierten Strukturen gebunden sind, die Infektiosität und dadurch die Luziferasegentransduktion durch sterische Inhibition verringern. Die Menge von in der viralen Membran verankertem EGFR-Protein wiederum ist sehr gering und wird erst durch eine Überexpression von Wildtyp- oder C-terminal trunziertem EGFR in den Produktionszellen signifikant (Henriksson, 1999). Somit ist anzunehmen, dass die Menge von gebundenem EGFR-Antikörper zu gering ist, um ebenfalls diese sterische Hinderung zu bewirken.

Aufgrund der oben erhaltenen Ergebnisse wurden zur chemischen Fixierung (siehe 3.5.1) die Zeitpunkte 5, 20 und 60 Minuten nach Beginn der interretroviralen Fusion für die Zugabe von Glutaraldehyd gewählt, da man möglichst viele konformationelle Phasen der Fusion abdecken wollte.

4.3 PV-Produktion und -Proteinzusammensetzung

Die Proteinzusammensetzung von Pseudovirionen, insbesondere im Bezug auf die Menge an eingebautem Env-Glykoprotein, CD4 und CXCR-4, sowie hinsichtlich Verunreinigungen mit nicht viralen Proteinen, ist von zentraler Bedeutung für die angestrebte Induktion einer Immunantwort gegen konformationelle Epitope auf Env. Darüber hinaus ist es erstrebenswert, ein effizientes Protokoll zur Herstellung großer Mengen möglichst reiner Pseudovirionen zu etablieren.

Im Laufe dieser Arbeit wurden die Verfahren zur PV-Herstellung betreffend PV-Qualität und der Effizienz der Handhabung und Quantität wesentlich verbessert. Somit lässt sich erklären, warum in ersten Immunisierungsversuchen PV-Vakzine von schlechterer Qualität und in nachfolgenden Versuchen Vakzine besserer Qualität verwendet wurden.

4.3.1 PV-Produktion in Zellkulturschalen

Am Anfang dieser Arbeit wurden PV-Präparationen durch Kalzium-Phosphat-Kotransfektionen von 1) Env^{WT}-, 2) Env^{Fus}- oder 3) CD4- und CXCR-4-Expressionskonstrukten mit Verpackungskonstrukten (siehe Abb. 4.1) in 293T-Zellen generiert. Die Transfektion und die PV-Produktion erfolgten in 20 154 cm²-Zellkulturschalen in DMEM^k (mit 10% FCS). Zwei bis drei Tage nach der Transfektion wurde der gefilterte Zellkulturüberstand (400 ml) ultrazentrifugiert und der Niederschlag in PBS aufgenommen.

Die Menge an Pseudovirionen im Zellkulturüberstand lag bei 1-1,5 µg/ml (ermittelt durch CA-ELISA, siehe 3.6.8). Die Ausbeute im Niederschlag nach Ultrazentrifugation lag bei 10-20%. Auf diese Weise wurden zwischen 40 und maximal 120 µg Pseudovirionen (CA) pro Versuch

hergestellt. Die Qualität der Pseudovirionen wurde durch die Analyse der PV-Proteinzusammensetzung unter Verwendung einer denaturierenden SDS-PAGE und anschließender Commassie-Blau-Färbung des Gels überprüft (siehe weiter unten Abb. 4.8). Für die Herstellung von 320 µg Pseudovirionen, die für ein Standard-Immunisierungsexperiment mit acht Mäusen benötigt werden, mussten 53-160 154 cm²-Zellkulturschalen transfiziert werden, die einem Zellkulturüberstand von insgesamt 1,0-3,2 Liter entsprechen. Die Herstellung der erforderlichen Mengen an Pseudovirionen für die Immunisierungsexperimente in Tieren war mit großem Arbeits- und Zeitaufwand verbunden.

4.3.2 Verbesserungen der PV-Produktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, Möglichkeiten zur Verbesserung der PV-Produktion und -Qualität zu finden. Mit geringerem Aufwand sollten Pseudovirionen mit höherer Reinheit hergestellt werden.

4.3.2.1 PV-Produktion in Medien mit reduziertem FCS-Gehalt

Um die Ultrazentrifugation größerer Volumen zu umgehen, wurde zunächst versucht, das Volumen der PV-enthaltenden DMEM^k-Zellkulturüberstände durch Ultrafiltration (siehe 3.3.6.1) zu verringern. Dies führte jedoch zu einer Erhöhung der Konzentration des im Medium enthaltenen FCS. Das Medium wurde viskos, und daraus abzentrifugierte Pseudovirionen waren stark mit BSA verunreinigt. Es wurde deshalb versucht, Pseudovirionen in Medien mit reduziertem Proteingehalt zu generieren. Dazu wurden 293T-Zellen in serumfreien Medien (siehe 2.13.2) (KGM (*Keratinocyte Growth Medium*), SFM (*Serumfreies Medium*) und EGM (*Epithelial Cell Growth Medium*)) gezüchtet.

Wie in Abb. 4.7, A dargestellt, wurden nach Transfektionen jedoch keine Pseudovirionen in diesen Zellen produziert. Das Wachstum der Zellen in diesen Medien war gering (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die PV-Produktion dann erst nach Züchtung und Transfektion der Zellen in DMEM^k in den verschiedenen serumfreien Medien durchgeführt. Außerdem wurde zur PV-Produktion DMEM mit reduziertem FCS-Gehalt (3%) verwendet. In allen Fällen war die PV-Produktion reduziert oder fand nicht statt. Bei der PV-Produktion mit 3% FCS in DMEM lag der PV-Anteil bei 60% der maximal möglichen Produktion.

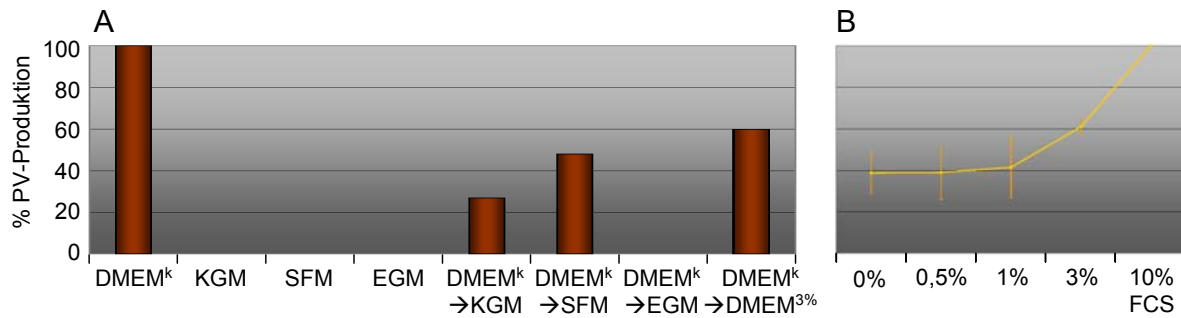


Abb. 4.7: PV-Produktion bei der Verwendung verschiedener Medien (A) und unterschiedlicher Konzentrationen von FCS in DMEM (B).

Gezeigt ist der prozentuale Anteil an in einer Kalzium-Phosphat-Transfektion von 293T-Zellen produzierten Pseudovirionen. Die Menge an Pseudovirionen wurde durch einen CA-ELISA ermittelt. (A) Die PV-Konzentration in DMEM^k (Transfektion und PV-Produktion in DMEM^k mit 10% FCS) wurde dabei auf 100% gesetzt. Die Präparationen, in denen für die Transfektion und die Produktion ein und dasselbe Medium verwendet wurde, sind mit KGM, SFM und EGM bezeichnet. Die Präparationen, in denen die Transfektion in DMEM^k und die PV-Produktion anschließend im entsprechenden serumfreien Medium durchgeführt wurden, sind mit DMEM^k→KGM, →SFM, →EGM und →DMEM^{3%} bezeichnet. (B) Abhängigkeit der PV-Produktion von der Konzentration an FCS in DMEM-Zellkulturmedium. Die PV-Konzentration in DMEM mit 10% FCS wurde dabei auf 100% gesetzt. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert der erhaltenen Daten aus zwei Experimenten dar; der Fehlerbalken ergibt sich aus der Standardabweichung der Werte.

DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, KGM = *Keratinocyte Growth Medium*, SFM = Serumfreies Medium, EGM = *Epithelial Cell Growth Medium*.

Daher wurde die Abhängigkeit der PV-Produktion von der Konzentration an FCS im Medium analysiert (siehe Abb. 4.7, B). Vier Stunden nach der Transfektion in DMEM^k wurden die Zellen mit dem entsprechenden Medium überschichtet. Es ist zu sehen, dass die PV-Produktion mit einem sinkenden Anteil von FCS in DMEM kontinuierlich abnimmt und ohne FCS-Zusatz bei 40% des Wertes von DMEM^k liegt. Ausschließlich 293T-Zellen in FCS-freiem DMEM zeigten bei Betrachtung im Durchlichtmikroskop einen veränderten Phänotyp sowie verstärkte Apoptose. In diesem Fall bestand das Risiko, dass verstärkt Zellfragmente und Vesikel die PV-Präparation verunreinigen könnten. Als Kompromiss wurde, trotz des ermittelten Produktionsverlusts von 60%, DMEM mit 0,5% FCS für die PV-Produktion in Zell-Factories (siehe 4.3.2.2) gewählt.

4.3.2.2 Zell-Factories

Wie unter 3.3.4 im Detail beschrieben, wurde die PV-Produktion schließlich in so genannten Zell-Factories etabliert. Bei den Zell-Factories handelt es sich um Zellkulturgefäße mit mehreren Ebenen und einer Gesamtfläche von 6260 cm², was der Fläche von 40 großen Zellkulturschalen (154 cm²) entspricht. Dabei wurden 293T-Zellen am Vortag der Transfektion halbdicht in 1000 ml DMEM^k (mit 10% FCS) ausgesät. Nach der Kalzium-Phosphat-Transfektion wurden PV-produzierende 293T-Zellen in DMEM mit nur 0,5% FCS kultiviert. Bei dem gängigen und bisher verwendeten Transfektionsprotokoll wird das

Kalzium-Phosphat-DNA-Kopräzipitat durch langsames Tropfen der CaCl_2 /DNA-Lösung in HBS erhalten. Um dabei ein gutes Durchmischen zu gewährleisten, wurden Endvolumen von 1500 μl nicht überschritten, d.h. für jede Platte wurde ein Präzipitat hergestellt. Bei den für die *Factories* notwendigen großen Volumen von Transfektionslösungen kam nach Rücksprache mit B. Leuchs, DKFZ Heidelberg, ein verändertes Transfektionsprotokoll zum Einsatz (siehe 3.3.4). Die großen Volumen erlauben bei schneller Zugabe der CaCl_2 /DNA-Lösung (55 ml) in HBS (55 ml) eine gute Durchmischung und hohe Transfektionseffizienzen. Zwei bis drei Tage nach der Transfektion wurden die 1000 ml Zellkulturüberstand filtriert, um Zellen und Zellfragmente zu entfernen, und anschließend ultrafiltriert (siehe 4.3.2.3).

4.3.2.3 Ultrafiltration

Aufgrund der geringen Konzentration von 0,5% FCS im DMEM konnte man Pseudovirionen ca. 25fach konzentrieren, indem mit Hilfe einer *Vivascience*-Filtereinheit ultrafiltriert wurde (siehe 3.3.6.1). Die Porengröße hielt Moleküle ab einem Molekulargewicht von 100 kDa zurück und ermöglichte somit eine Konzentration des filtrierten Zellkulturüberstands von 1000 ml auf 35 ml bei sehr geringem Verlust. Das Konzentrat wurde anschließend durch eine 20%ige Saccharoseschicht ultrazentrifugiert und der Niederschlag in PBS aufgenommen. Auch hier war die Ausbeute mit 70% sehr hoch.

Tabelle 4.1 gibt nochmals ein Überblick über das Zell-*Factory*/Ultrafiltrations-Protokoll und die Ausbeuten an Pseudovirionen (CA) bei den einzelnen Schritten. Es sind die Ergebnisse eines optimalen Experiments angegeben. Die Ausbeuten von zahlreichen Zell-*Factory*/Ultrafiltrations-Experimenten lagen zwischen 0,5 und 2,8 mg Pseudovirionen (CA) im Niederschlag.

Tab. 4.1: Zusammenfassung der PV-Herstellung in Zell-*Factories* und anschließender Ultrafiltration mit Angaben durchgeführter Schritte und dabei erhaltener Ausbeuten.

Std.	Schritte	Konzentration an Pseudo- viren (CA) [µg/ml]	Volumen [ml]	Menge an Pseudo- viren (CA) insgesamt [µg]	Ausbeute [%]
0	Halbkonfluentes Aussäen von 293T-Zellen in Zell- <i>Factories</i> in DMEM ^K .				
24	Kalzium-Phosphat-Transfektion in Zell- <i>Factories</i> in DMEM ^K .				
28	Mediumwechsel: Transfektionsüberstand wird abgenommen und zur Partikelproduktion DMEM mit 0,5% FCS zugegeben.				
72	a) Ernten des PV-Zellkulturüberstands.	4,4	1000	4400	
	b) Filtration durch einen 0,45 µm-Filter.	3,9	1000	3900	100% (Ausgangswert)
	c) Ultrafiltration durch eine <i>Vivascience</i> -Filtereinheit (100 kDa Porengröße).				
	-1- Filtrat	0,017	950	16	0,4%
	-2- Konzentrat	114	35	3990	>100%
	-3- Waschfraktion des Filters	4,3	50	215	5,5%
	d) Ultrazentrifugation des Konzentrats durch eine 20%ige Saccharoseschicht und Resuspension des Niederschlags in PBS.	14000	0,2	2800	72%

Details siehe Text. Die Menge an Pseudoviren wurde mittels CA-ELISA bestimmt.

4.3.3 Mit Coomassie-Blau färbbare Proteine in PV-Präparationen

Die Analysen zur Proteinzusammensetzung der in verschiedener Weise produzierten Pseudovirionen sind in Abb. 4.8 dargestellt.

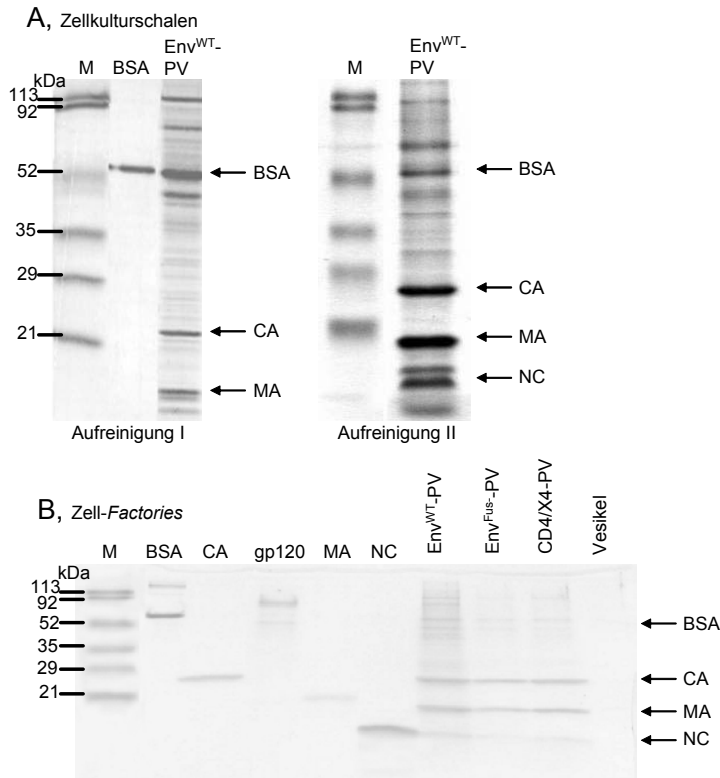


Abb. 4.8: Coomassie-Färbung der Proteine von Pseudovirionen, die in Zellkulturschalen (A) oder in Zell-Factories (B) hergestellt wurden.

Dargestellt sind die Proteinzusammensetzungen (A) von 1 µg Env^{WT}-PV (CA), die in Zellkulturschalen in DMEM^k, und (B) von 1 µg Env^{WT}-PV, Env^{Fus}-PV, CD4/X4-PV (CA) und einer Vesikelkontrolle, die in Zell-Factories mit anschließender Ultrafiltration hergestellt wurden. Im Vergleich dazu ist je 1 µg aufgereinigtes BSA-, CA-, gp120, MA- und NC-Protein aufgetragen. Pseudovirionen und Standardproteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt. M = Marker.

In Abb. 4.8, A wurden jeweils 1 µg einer PV-Präparationen (CA) aus Zellkulturschalen zusammen mit einem Proteingrößenstandard (M) und mit 1 µg BSA-Protein in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Erwartungsgemäß waren die Proteinmengen sowohl von CA als auch von MA in den analysierten PV-Aufreinigungen recht hoch. Allerdings weisen die zusätzlichen Banden auf deutliche Verunreinigungen, bedingt durch das FCS des Zellkulturüberstands, hin. Am stärksten ausgeprägt war eine zusätzliche und nicht durch virale Proteine hervorgerufene Bande an der Position von BSA. Es ist, zumindest in einer der PV-Präparationen (links in Abb. 4.8, A), deutlich zu erkennen, dass mehr BSA als CA enthalten war. Von zahlreichen analysierten Aufreinigungen zeigen diese zwei PV-Präparationen (siehe Abb. 4.8, A) die Ober- und Untergrenze an Verschmutzung virusfremder Proteine. Diese Verunreinigungen in Kombination mit der starken Immunogenität von BSA und den vergleichbar geringen Mengen

an Env-Protein im PV-Vakzin (keine sichtbare Bande an der Position von gp120- und gp41-Protein, siehe auch 4.3.4) deuten darauf hin, dass es bei der Verwendung dieser Präparationen für Immunisierungen zu Schwierigkeiten kommen kann. Bei Analysen der immunisierten Tiere (siehe 4.5.1) konnte dieser Verdacht auch bestätigt werden.

Abb. 4.8, B zeigt das Ergebnis einer Untersuchung der Proteinzusammensetzung dreier verschiedener PV-Präparationen, die mit dem Zell-*Factory*/Ultrafiltrations-Protokoll hergestellt wurden. Außerdem wurde unter Verwendung des gleichen Protokolls eine Vesikelkontrolle produziert und aufgereinigt. In diesem Fall wurden Zellen mit dem nicht relevanten Expressionsplasmid für trunkierten EGFR, pTrEGFR, (Henriksson *et al.*, 1999) transfiziert. Jeweils 1 µg Pseudovirionen (CA) wurden zusammen mit einer vergleichbaren Menge der Vesikelpräparation in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Neben dem Marker wurden auch je 1 µg gereinigte BSA-, CA-, gp120-, MA- und NC-Proteine aufgetragen. Somit war es möglich, neben der Betrachtung des molekularen Gewichts auch direkt die Proteine der PV- und Vesikelpräparation mit den Standardproteinen in Beziehung zu setzen und die Mengenverhältnisse abzuschätzen. Die BSA-, CA-, MA- und NC-Proteine der Pseudovirionen konnten eindeutig den Standardproteinen zugeordnet werden.

Im Gegensatz zu den beträchtlichen Kontaminationen mit BSA und anderen Proteinen der PV-Präparationen, die auf konventionelle Weise mit Transfektion in Zellkulturschalen und anschließender Ultrazentrifugation hergestellt wurden (siehe Abb. 4.8, A), enthielten diese Pseudovirionen neben den Strukturproteinen MA, CA und NC nur sehr wenige weitere Proteine. Das in Bakterien produzierte MA-Standardprotein läuft in der SDS-PAGE langsamer als das MA-Protein der Pseudovirionen, was vermutlich auf unterschiedliche Modifikationen zurückzuführen ist.

4.3.4 Nachweis von eingebautem Env-Glykoprotein und eingebautem CD4-Protein in Pseudovirionen

In Abb. 4.8 sind keine spezifischen färbbaren Banden an der Position von Env-Proteinen (gp120/41) bzw. CD4 und CXCR-4 sichtbar. Zur Analyse der geringen Mengen an Env- bzw. CD4-Proteinen wurden Env^{WT}-PV (siehe Abb. 4.9, A) bzw. CD4/X4-PV (siehe Abb. 4.9, B) in einer semiquantitativen Western-Blot-Analyse auf den gp120- bzw. CD4-Einbau hin untersucht.

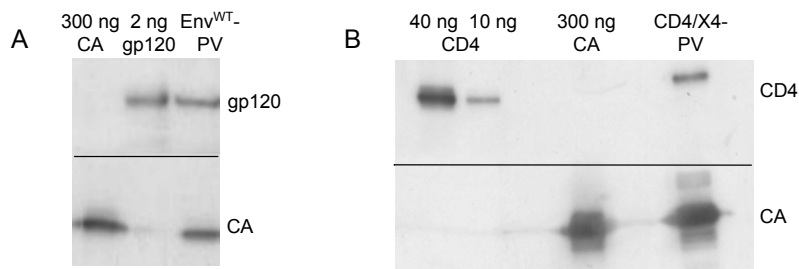


Abb. 4.9: Western-Blot-Analyse von Env^{WT}- und CD4/X4-PV zur semiquantitativen Bestimmung des gp120- und CD4-Einbaus in Pseudovirionen.

(A) Einbau von gp120-Protein in Pseudovirionen: 200 ng Env^{WT}-PV (CA) und als Proteinstandards 300 ng CA-Protein und 2 ng gp120-Protein wurden in einer Western-Blot-Analyse (mit rb α -gp120- bzw. Mab183 als Primärantikörper) untersucht. (B) Einbau von CD4 in CD4/X4-PV: 300 ng CD4/X4-PV und als Proteinstandard 300 ng CA-Protein und 40 bzw. 10 ng CD4-Protein wurden in einer Western-Blot-Analyse (mit rb α -CD4- bzw. Mab183 als Primärantikörper) untersucht.

In Abb. 4.9, A wurden 2 ng gp120 Proteinstandard und 300 ng CA Proteinstandard zusammen mit 200 ng Env^{WT}-PV (CA) aus Zellkulturschalen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch eine Western-Blot-Analyse mit Env- und CA-Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Diese Analyse zeigt den Env-Einbau einer repräsentativen Env^{WT}-PV-Präparation. In der dargestellten Analyse wurden, bestimmt durch eine optische Abschätzung, in 200 ng Env^{WT}-PV (CA) etwa 2 ng gp120 eingebaut, was einem Mengenverhältnis von gp120 zu CA von 1:100 entspricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden über 30 solcher Einbauversuche durchgeführt, in denen gezeigt wurde, dass im Falle von Env^{WT}-PV zwischen 100-200 ng gp120 und im Falle von Env^{Fus}-PV zwischen 200-400 ng gp120 in 10 μ g Pseudovirionen (CA) eingebaut wurden. Das entspricht für Env^{WT}-PV einem molaren gp120/CA-Verhältnis von 1:500-1:250 und für Env^{Fus}-PV einem Verhältnis von 1:250-1:125 (siehe 6.3).

Zur Analyse des CD4-Einbaus in Pseudovirionen wurden 40 und 10 ng CD4-Proteinstandard und 300 ng CA-Proteinstandard mit 300 ng CD4/X4-PV (CA) aus Zellkulturschalen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend durch eine Western-Blot-Analyse mit CD4- bzw. CA-spezifischen Antikörpern spezifisch nachgewiesen. Die Analyse (siehe Abb. 4.9, B) zeigt den CD4-Einbau einer repräsentativen PV-Präparation. In der dargestellten CD4/X4-PV Analyse wurden, ebenfalls bestimmt durch eine optische Abschätzung, in 300 ng CD4/X4-PV (CA), ca. 20 ng CD4 eingebaut, was einem Mengenverhältnis von CD4 zu CA von 1:15 entspricht. In zahlreichen Einbauversuchen konnte gezeigt werden, dass 200-700 ng CD4-Protein in 10 μ g Pseudovirionen (CA) inkorporiert werden. Das molare CD4/CA-Verhältnis liegt zwischen 1:115 und 1:30 (siehe 6.3).

Da ein in der Western-Blot-Analyse funktioneller Antikörper gegen CXCR-4 im Labor nicht zur Verfügung stand, wurde CXCR-4 in der Immunfluoreszenz von 293T-Zellen, die für die CD4/X4-PV-Produktion transfiziert wurden, nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) und seine Funktionalität durch die Vermittlung von Infektiosität bestätigt (siehe 4.2.1).

Die Verwendung verschiedener anderer proviraler und subviraler Verpackungskonstrukte (siehe Abb. 4.1) und unterschiedlicher PV-Produktionsprotokolle (siehe 3.3.3 und 3.3.4) brachte keine Änderung im Env- und CD4-Einbau in Pseudovirionen.

4.4 Versuche zur Erhöhung des Env-Einbaus in Pseudovirionen

Da die durch das zu verwendende Vakzin induzierte Immunantwort gegen das HIV-Env Glykoprotein gerichtet sein sollte und das Env-Protein, wie oben gezeigt (siehe Abb. 4.9, A), in der PV-Präparation nicht besonders stark vertreten war, wurde durch Manipulationen versucht, die Menge an inkorporiertem Env-Protein in Pseudovirionen zu erhöhen. Die Strategie bestand darin, mit freundlicher Unterstützung von T. Pfeiffer aus unserer Arbeitsgruppe, die Env-Expression in transfizierten Zellen zu erhöhen und damit passiv den Einbau von Env-Glykoprotein in Pseudovirionen zu steigern. Das sollte zum einen durch den Austausch des homologen HIV-Env-Signalpeptids (SP) gegen ein heterologes Signalpeptid erfolgen. In einem zweiten Ansatz wurde dies durch Verwendung eines kodonoptimierten Expressionskonstrukts versucht.

4.4.1 HIV-1-Env mit heterologem Signalpeptid

Sekretorische Proteine und beinahe alle Membranproteine werden mit einem Signalpeptid synthetisiert, das während der Proteinsynthese und dem gleichzeitigen Eindringen ins Endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten wird. Die Abspaltung des HIV-1-Env-Signalpeptids im Endoplasmatischen Retikulum ist jedoch verzögert (Li *et al.*, 2000), was zu einer ebenfalls verzögerten Faltung und einer Verlangsamung des intrazellulären Transports des Env-Glykoproteins führt.

Für unsere Untersuchungen fand das einfach negativ geladene Epo- (Erythropoetin) (Herrera *et al.*, 2000) bzw. das mehrfach positiv geladene *tissue plasminogen activator* (tPA)-Signalpeptid (Binley *et al.*, 2000) anstelle des mehrfach positiv geladenen HIV-1-Env-Signalpeptids Verwendung. Die Aminosäuresequenz und die Aminosäureladungen der verschiedenen Signalpeptide sind in Abb. 4.10, A dargestellt.

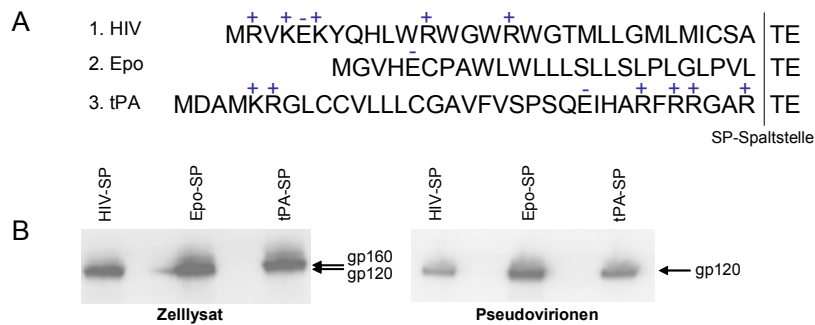


Abb. 4.10: Signalpeptid (SP)-Austausch: SP-Sequenzen, Env-Expressionslevel und Env^{WT}-Einbau in Pseudovirionen bei Verwendung verschiedener Signalpeptide.

(A) Gezeigt sind die Aminosäuresequenzen und die Ladungen des HIV-1-Env-Signalpeptids und zweier heterologer Signalpeptide (Epo = Erythropoetin, tPA = *tissue plasminogen activator*). (B) Western-Blot-Analyse (mit α -gp120 als Primärantikörper) des Einflusses des Signalpeptidaustauschs auf die Env-Expression in 293T-Zellen (links) und den Env-Einbau in Pseudovirionen (rechts).

Die Signalpeptidaustausche fanden in dem Plasmid pGRE-Menv, einem Expressionskonstrukt für das M-trope Env-Protein des HIV-1-Stamms Ad8, statt.

Um die Höhe des Expressionsniveaus der klonierten Konstrukte und deren Einbau in Pseudovirionen zu untersuchen, erfolgte eine Transfektion von jeweils 10 μ g Env-Expressionsplasmid mit pNL4-3- $\Delta\Psi\Delta$ Env in 293T-Zellen. Freigesetzte Pseudovirionen wurden durch Ultrazentrifugation aus den Kulturüberständen aufgereinigt und auf gleiche CA-Mengen im ELISA (siehe 3.6.8) abgeglichen. Abb. 4.10, B zeigt eine Western-Blot-Analyse der Zell- und Viruslysate.

Die exprimierten Mengen an Env-Protein (gp160/gp120) wurden durch den Austausch des Signalpeptids nicht signifikant erhöht. Es konnte auch kein deutlich verbesserter Env-Einbau in Pseudovirionen festgestellt werden. Deshalb wurden die Konstrukte mit heterologem Signalpeptid für die Produktion von Env-PV nicht weiter verwendet.

4.4.2 Kodonoptimiertes HIV-1-Env

Die Kodonverwendung von HIV ist nicht dieselbe wie in menschlichen Zellen. Hinzu kommt, dass negative Elemente in HIV *gag*, *pol* und *env* eine Translokation der Wt-HIV-mRNA verhindern, wenn HIV-Rev bzw. das *Rev-responsible element* (RRE) nicht vorhanden sind (siehe 1.5.2). Bei so genannten kodonoptimierten HIV-1-Env-Sequenzen wurden die Kodons der jeweiligen Aminosäuren auf die überwiegend in menschlichen Zellen verwendeten Kodons abgestimmt. Humanisierte Env-Sequenzen zeigen eine starke, Rev-unabhängige Expression des Glykoproteins in menschlichen Zellen (Haas *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein kodonoptimiertes Env-Expressionskonstrukt tatsächlich besser exprimiert wird als das bisher verwendete Rev-abhängige β AK-Env^{WT} (BH10). Ein Expressionsplasmid für das kodonoptimierte *env*-Gen des HIV-1-Isolats 89.6P wurde von R.

Wagner, Regensburg, zur Verfügung gestellt. 10 µg der jeweiligen Plasmid-DNA wurden für eine Transfektion von 293T-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden 48 Stunden später mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht (siehe Abb. 4.11, A). Im Gegensatz zu mit pßAk-Env^{WT} transfizierten Zellen sind die mit pCMV89.6P transfizierten Zellen stark beschädigt (siehe Abb. 4.11, A, rechts). Dies deutet auf eine zytotoxische Wirkung des kodonoptimierten Konstrukts hin, vermutlich als Ergebnis der hohen Expression (siehe unten). In folgenden Versuchen wurden die Zellen dann mit einer geringeren Menge an kodonoptimiertem Plasmid transfiziert.

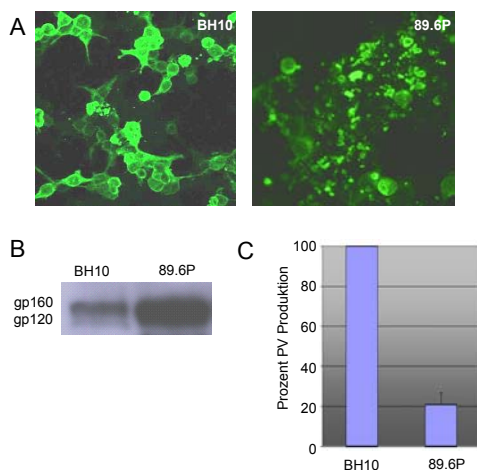


Abb. 4.11: Kodonoptimiertes Env (89.6P) im Vergleich zu BH10-Env (Env^{WT}). Immunfluoreszenzen und Expressionslevel in Zelllysaten von transfizierten 293T-Zellen und Einfluss auf die PV-Produktion.

(A) Gezeigt ist eine repräsentative Immunfluoreszenz (mit H902 als Primärantikörper) von mit 10 µg Expressionskonstrukt für BH10-Env (Env^{WT}) bzw. 89.6P-Env transfizierten 293T-Zellen. (B) Western-Blot-Analyse (mit rb α-gp120 als Primärantikörper) von Lysaten von 293T-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion von 2 µg des jeweiligen Plasmids. (C) Freisetzung von Pseudovirionen (CA) von 293T-Zellen 48 Stunden nach der Transfektion von 2 µg des entsprechenden Plasmids mit dem Verpackungskonstrukt. Es sind Ergebnisse eines CA-ELISAs aus zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Der Fehlerbalken ergibt sich aus der Standardabweichung der Werte.

Um die zellulären Expressionsniveaus der verschiedenen Env-Proteine zu analysieren, wurden 293T-Zellen mit je 2 µg pCMV89.6P-Plasmid-DNA beziehungsweise 2 µg pßAk-Env^{WT}-Plasmid-DNA transfiziert. Nach 24 Stunden wurden Zelllysate in einer Western-Blot-Analyse mit gp120-Antikörpern untersucht (siehe Abb. 4.11, B). Durch den Auftrag sowohl gleicher als auch verschiedener Mengen des Lysats (Daten nicht gezeigt) wurde nachgewiesen, dass 89.6P-Env in den Zellen ca. drei- bis fünfmal stärker exprimiert wird als BH10-Env.

Wie in Abb. 4.11, C zu sehen ist, führte die starke Expression von 89.6P-Env außerdem dazu, dass 48 Stunden nach Kotransfektionen mit dem Verpackungskonstrukt die Menge an gebildeten Pseudovirionen im Vergleich zu Kotransfektionen mit dem Env^{WT}-Expressionskonstrukt und dem Verpackungskonstrukt um den Faktor fünf zurückging. Dies

ist vermutlich ebenfalls eine Folge der zytotoxischen Wirkung der hohen 89.6P-Env-Expression, die auch schon mit Hilfe der Immunfluoreszenz gezeigt wurde (Abb. 4.11, A).

Das bedeutet, dass die hier erläuterten Bemühungen nicht zu der erhofften Produktion von Pseudovirionen mit erhöhten Mengen an eingebautem Env-Protein führten. Deshalb wurde auf die Verwendung des kodonoptimierten 89.6P-Envs für die Produktion von Env-PV verzichtet.

4.5 Immunogenität von PV-Präparationen in immunisierten Versuchstieren

In zahlreichen Versuchen mit nicht transgenen Mäusen wurde die Immunogenität der Vakzinpräparationen getestet. Pseudovirionen aus Zellkulturschalen bzw. später aus Zell-*Factories* wurden mit zwei verschiedenen Immunisierungsprotokollen (siehe 3.7.1 und 3.7.2) auf die Induktion von Env-Titern in Seren untersucht. Es wurde außerdem versucht, aus den Lymphknoten bzw. den Milzen immunisierter Versuchstiere Env-spezifische Hybridome zu generieren.

4.5.1 Env-Titer in den Seren immunisierter Versuchstiere

In Abb. 4.12 ist eine Zusammenstellung der relevanten Ergebnisse aus fünf tierexperimentellen Versuchen an insgesamt über fünfzig BALB/C-Mäusen dargestellt. Dabei sollte in diesen Experimenten die Frage beantwortet werden, wie hoch die gp120- und gp41-Bindungstitern in den Seren immunisierter Tiere sind, die mit verschiedenen Immunisierungsprotokollen und verschiedenen Präparationen immunisiert wurden. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden die Seren aus drei der fünf verschiedenen Immunisierungsexperimente in einem einzigen ELISA analysiert.

Bei den Immunisierungsprotokollen handelt es sich zum einen um das unter 3.7.1 beschriebene kurze 7 Tage-Protokoll (Bynum *et al.*, 1999) (siehe Abb. 4.12, A, Env^{Fus}-PV, kurz) und zum anderen um ein Standard-Immunisierungsprotokoll über einen Zeitraum von zwei Monaten (siehe 3.7.2 und Abb. 4.12, A, Env^{Fus}-PV, lang; B; C). Als Präparationen wurden die weniger reinen, in Zellkulturschalen hergestellten (siehe 3.3.3, Abb. 4.12, A, B) und die reineren, aus Zell-*Factories* gewonnenen Pseudovirionen (siehe 3.3.4, Abb. 4.12, C), verwendet.

Dabei handelte es sich um Env^{Fus}- oder CD4/X4-PV allein oder um das Env^{Fus}-Vakzin (siehe 3.5.2) oder eine Vesikelkontrolle (siehe unten).

Die Menge an immunisierten Env-PV in Freund's komplettem Adjuvans war 10 µg (CA) für die Erstimmunisierung und 5 µg (CA) für die weiteren zwei *boosts* in Freund's inkomplettem Adjuvans.

gp120- und gp41-Titer wurden gegen gebundenes gp120-Protein bzw. gebundenes gp41-Protein (extrazellulärer Teil) ermittelt. Als Hintergrundkontrolle wurden die Seren auf die gebundene Blockierungssubstanz Casein getestet.

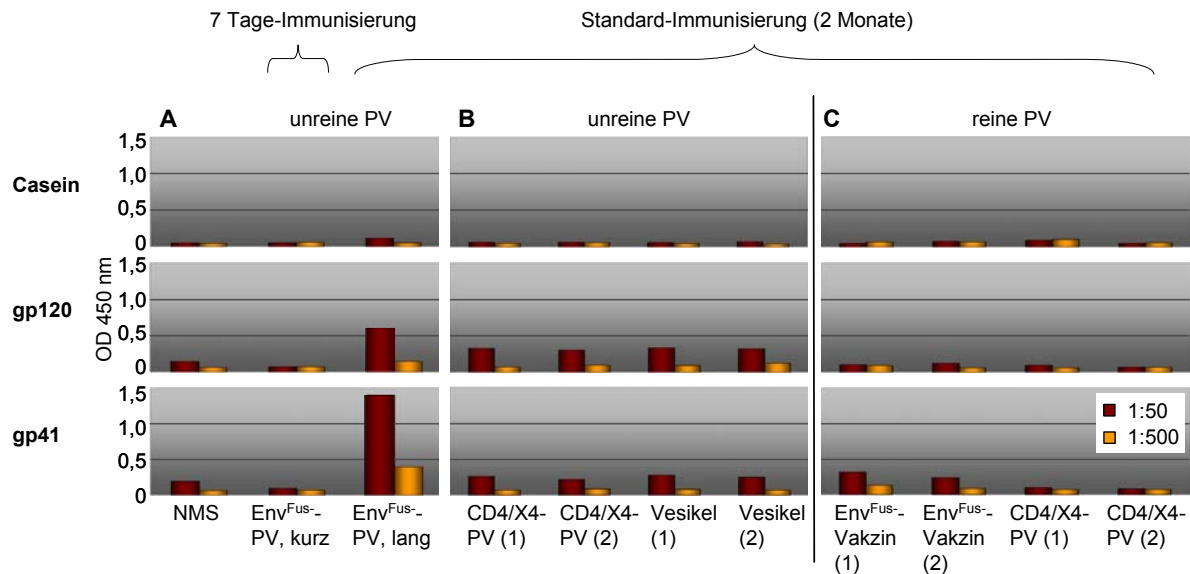


Abb. 4.12: gp120- und gp41-Antikörpertiter von Seren immunisierter Mäuse.

Gezeigt sind die Messwerte eines gp120 (Mitte)-, gp41 (unten)- und, als Hintergrundkontrolle, Casein (oben)-ELISAs von 1:50 (rot) und 1:500 (orange) verdünnten Seren. Die Seren stammen aus drei verschiedenen Immunisierungsexperimenten (A-C), die zusammen auf einer ELISA-Platte analysiert wurden. (A) Mäuse wurden, wie in 3.7.1 und 3.7.2 beschrieben, mit unreinen Env^{Fus}-PV (aus Zellkulturschalen) immunisiert: Dafür wurden ein 7 Tage-Protokoll (kurz) und ein Standard-Immunisierungsprotokoll (lang) verwendet. NMS = normales Mausserum. (B) Mäuse wurden, wie in 3.7.2 beschrieben, mit unreinen Negativkontrollen (aus Zellkulturschalen: CD4/X4-PV oder Vesikel) mit einem Standard-Immunisierungsprotokoll immunisiert. (C) Mäuse wurden mit reinem Env^{Fus}-Vakzin oder reinen CD4/X4-PV (aus Zell-Factories) mit einem Standard-Immunisierungsprotokoll (siehe 3.7.2) immunisiert.

Die Zahlen in Klammern unterscheiden die zwei Ratten pro Immunisierung eines Präparats.

In Abb. 4.12, A sind die gp120- und gp41-Titer der kurzen und langen Immunisierungen mit Env^{Fus}-PV der schlechteren Qualität (siehe 4.3.3) gezeigt. Im Serum des Tieres, das eine Standard-Immunisierung über zwei Monate erhalten hat, wurden signifikante, aber dennoch recht niedrige Titer gegen gp120 und gp41 erreicht, während keine Titer gegen Casein nachgewiesen wurden. Die Seren der nicht immunisierten Tiere (beispielhaft ein Tier, NMS, gezeigt) waren negativ. Eine Immunisierung im Zeitraum von sieben Tage ergab keine signifikante Env-Immunantwort.

In einer weiteren tierexperimentiellen Untersuchung wurden zwei Negativkontrollen mit dem Standard-Immunisierungsprotokoll durchgeführt (siehe Abb. 4.12, B). Dabei handelte es sich um 10 µg unreine CD4/X4-PV (CA) und eine Vesikelkontrolle. Die entsprechende Menge einer Vesikelkontrolle bestand aus filtriertem und ultrazentrifugiertem Zellkulturüberstand von 293T-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid für TrEGFR transfiziert worden waren.

In Abb. 4.12, B wird deutlich, dass die Seren dieser Tiere niedrige, aber signifikante Titer gegen gebundenes gp120- und gp41-Protein zeigen und gegen Casein negativ sind. Trotz

der Schwierigkeit eines direkten Vergleichs zweier unterschiedlicher Immunisierungsexperimente scheint nun, angesichts dieses Ergebnisses, der positive gp120-Titer in Abb. 4.12, A, Env^{Fus}-PV, lang, nicht mehr signifikant, während der gp41-Titer nach wie vor über dem Hintergrund liegt. Die Hintergrundreaktivitäten in Abb. 4.12, B könnten auf Antikörperkreuzreaktivitäten zurückzuführen sein. Möglicherweise wurden Antikörper gegen z.B. die Oligosaccharide auf Glykoproteinen im Serum (vor allem BSA) induziert, die dann mit dem stark glykosylierten gp120-Protein reagierten.

Die Resultate von Abb. 4.12, A und B wurden in einem weiteren Immunisierungsexperiment, dessen relevante Ergebnisse in Abb. 4.12, C zusammengefasst sind, bestätigt. Hierfür wurden reine PV-Präparationen, die mit dem Zell-Factory/Ultrafiltrations-Protokoll hergestellt wurden, mit einem Standard-Immunisierungsprotokoll injiziert. Dabei handelt es sich um 20 µg Env^{Fus}-Vakzin (CA) und 10 µg CD4/X4-PV (CA). Die gp120- und gp41-Titer der Negativkontrolle (CD4/X4-PV) liegen in der Hintergrundreaktivität gegen gebundenes Casein. Wie schon bei dem in Abb. 4.12, B dargestellten Versuch erhielt man auch bei den reinen Präparationen niedrige, aber signifikante gp41-Titer, allerdings keinen messbaren gp120-Titer. Das Problem der Antikörperkreuzreaktivitäten besteht bei Immunisierungen mit reinen Pseudovirionen nicht mehr.

Zusammenfassend zeigen diese Immunisierungsversuche in Mäusen, dass Immunisierungen mit einem PV-Vakzin allein nur sehr geringe gp120/41-Antikörpertiter induzieren, vermutlich als Ergebnis der geringen Menge an eingebautem Env-Protein in Pseudovirionen. Des Weiteren zeigt die Präsenz von unspezifischen, aber kreuzreaktiven Antikörpern gegen gp120/41, zumindest bei den unreinen PV-Präparationen, die Notwendigkeit zusätzlicher Kontrollen.

4.5.2 Versuche zur Herstellung HIV-1- Env-spezifischer muriner Hybridomzellen

Da das hier verwendete PV-Vakzin unter anderem die humanen Proteine huCD4 und huCXCR-4 enthält, wurden nach Immunisierungen in Mäusen, die nicht transgen für huCD4 und huCXCR-4 sind, unter Umständen auch Antikörper gegen diese Proteine gebildet. Antikörper gegen CD4 bzw. CXCR-4 können eine HIV-Infektion inhibieren, indem sie an CD4- und CXCR-4-Rezeptoren auf Zielzellen binden (Mizukami *et al.*, 1988). Aus diesem Grund ist es nicht ratsam, Virusneutralisationstests mit Seren dieser Mäuse durchzuführen. Um jedoch zu untersuchen, ob HIV-Env-spezifische neutralisierende Antikörper gebildet wurden, sollten Env-spezifische monoklonale Antikörper zur Analyse des Neutralisationsvermögens von Virusisolaten verwendet werden. Diese sollten aus den Lymphknoten und/oder den Milzen immunisierter Versuchstiere generiert werden.

In zwei Ansätzen wurden jeweils zwei BALB/C-Mäuse mit je 20 µg Env^{WT}- oder Env^{Fus}-Vakzinpräparation (CA) (Pseudovirionen in Zellkulturschalen produziert) innerhalb von sieben Tagen dreimal intramuskulär immunisiert (siehe 3.7.1). Bynum *et al.* konnten zeigen, dass Hybridome, die spezifisch für das immunisierte Antigen sind, durch eine Lymphknotenfusion generierbar sind (Bynum *et al.*, 1999).

Jeweils ein Tier pro Immunisierungsansatz wurde nach sieben Tagen getötet. Es wurden von jeder Maus zwei Lymphknoten steril an den Beinen entnommen. Diese wurden vereint und, wie unter 3.8.3 beschrieben, für die Herstellung von Hybridomklonen verwendet. Die daraus generierten 250 Hybridomzellklone pro Maus wurden 10 Tage nach der Zellfusion in einem gp41/gp120-Antikörper-ELISA auf ein Gemisch von gp120- und gp41-Protein analysiert (siehe 3.6.9). In einem ersten *Screening* unverdünnter Zellkulturüberstände von insgesamt etwa 500 generierten Hybridomklonen wurden 21 sehr schwach positive gp120/41-spezifische Klone identifiziert und subkloniert, von denen 15 allerdings später ihre Antikörperproduktion einstellten und sechs starben. Zusätzlich wurden ca. 50 Klone hinsichtlich ihrer Produktion von CA-Antikörpern analysiert. 6 Klone wurden identifiziert und subkloniert, wovon zwei überlebten und weiterhin CA-Antikörper bildeten.

Die nach der 7 Tage-Immunisierung verbliebenen lebenden zwei Mäuse wurden aufgrund des oben beschriebenen Fehlens generierter Env-spezifischer Hybridome weitere zwei Male im Abstand von vier Wochen mit Env^{WT}- bzw. Env^{Fus}-Vakzinpräparationen (je 20 µg CA) *geboostet*. Zwei Wochen nach dem letzten *boost* wurden die Lymphknoten der Beine und die Milz von der mit Env^{Fus}-Vakzin immunisierten Maus für die Hybridomherstellung verwendet.

Im ersten *Screening* der Überstände von 1000 Hybridomzellklonen hinsichtlich ihrer Produktion von gp120- und gp41-Antikörpern wurden keine gp120/41-spezifischen Klone gefunden. Durch die erfolgreiche Generierung CA-spezifischer Hybridome (vier Klone wurden hier aus 200 analysierten Zellkulturüberständen hergestellt) wurde gezeigt, dass es nicht an der verwendeten Methodik der Hybridomherstellung, sondern vermutlich vielmehr an der schwachen Env-Immunantwort lag, dass es zum Ausbleiben einer Generierung Env-spezifischer Hybridomzellen kam.

Die verbleibende Maus (Env^{WT}-Vakzin) wurde ohne eine Milz- und Lymphknotenentnahme getötet.

4.6 Immunisierungen von Mäusen mit einer Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein

In 4.5.1 wurde gezeigt, dass die Immunisierung mit dem PV-Vakzin zu keiner Induktion von hohen gp120- und gp41-Antikörpertitern führte. Außerdem war es nicht möglich, durch eine Immunisierung mit dem Vakzin gp120- oder gp41-spezifische Hybridomzellen aus Lymphknoten oder Milzen immunisierter Tiere herzustellen (siehe 4.5.2). Die schwache Env-Immunantwort ist vermutlich das Ergebnis der geringen Konzentration des Env-Glykoproteins (siehe Abb. 4.9, A) und des Vorhandenseins nicht viraler Kontaminationen (BSA) in PV-Präparationen (siehe Abb. 4.8).

Um das Immunsystem effizienter auf die geringen Mengen von in Pseudovirionen enthaltenem gp120- und gp41-Protein zu lenken, wurde ein neues Immunisierungsprotokoll konzipiert. Durch eine subkutane Vorimmunisierung mit gereinigtem, rekombinantem gp120- und gp41-Protein sollten T-Helfer-Zellen (T_H -Zellen) induziert werden (siehe Abb. 4.13), die spezifisch für lineare Env-Epitope sind.

Bei der nachfolgenden Immunisierung mit PV-Vakzin und der Aufnahme der Pseudovirionen durch Env-spezifische Prä-B-Zellen müssten diese Zellen Env-spezifische Epitope auf MHCII-Molekülen präsentieren, die den linearen Env-Epitopen der Vorimmunisierung entsprechen. Somit dürften diese Prä-B-Zellen durch Zytokine der Env-spezifischen T_H -Zellen der Klasse II aktiviert werden können.

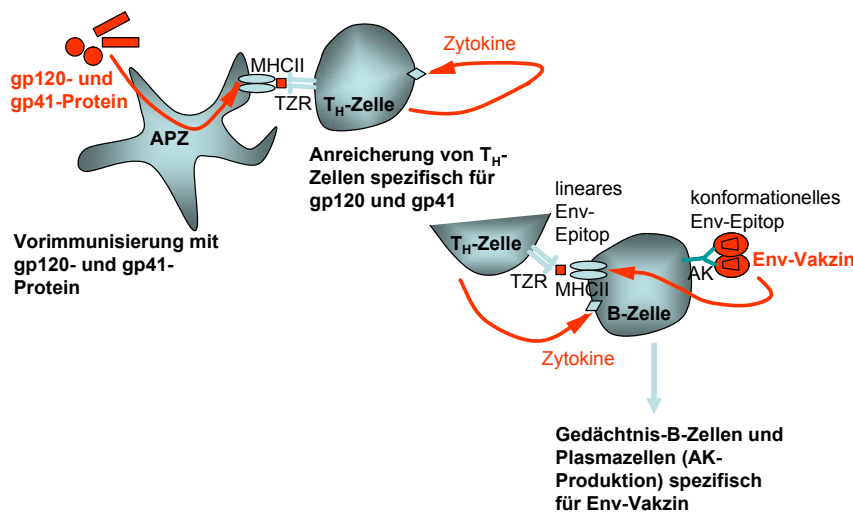


Abb. 4.13: Effekt einer Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein vor der Applikation des PV-Vakzins auf das Immunsystem.

Detaillierte Erläuterungen im Text.

APZ = Antigen-präsentierende Zelle, MHC = Haupthistokompatibilitätskomplex, TZR = T-Zell-Rezeptor.

Vier BALB/C-Mäuse wurden mit je 10 µg gp120-Protein (IIIB) und gp41-Protein (HXB-2) in Freund's komplettem Adjuvans subkutan vorimmunisiert (* steht dabei im Folgenden für diese Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein). Die eigentlichen Immunisierungen

(*boosts*) ohne Adjuvans mit je 10 µg Env^{WT}-Vakzin (CA) (*Env^{WT}-Vakzin (1) und (2)) oder 10 µg Env^{Fus}-Vakzin (CA) (*Env^{Fus}-Vakzin (1) und (2)) in jeweils zwei Mäusen erfolgten intraperitoneal drei und fünf Wochen und ein letzter intravenöser *boost* sieben Wochen nach der Vorimmunisierung (Pseudovirionen wurden dafür in Zellkulturschalen produziert). Drei Tage danach wurden die Mäuse getötet. Zur Gewinnung der Seren wurde Blut gesammelt und die Milzen der Tiere zur Herstellung von Hybridomklonen verwendet.

Das Konzept dieses Immunisierungsschemas beruht darauf, dass zur Zeit der Milzfusion die meisten Env-spezifischen fusionierbaren B-Zellen spezifisch für Env-Proteine der *boosts* sein sollen, also gegen konformationelle Env-Epitope. Dagegen sollen sie nicht mehr spezifisch für die Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein sein.

4.6.1 Analyse der Seren immunisierter Mäuse

Die Seren der wie oben beschriebenen immunisierten Mäuse wurden in 1:50- und 1:500-Verdünnungen auf das Vorhandensein von gp120- und gp41-Antikörpern in einem ELISA (siehe 3.6.9) untersucht.

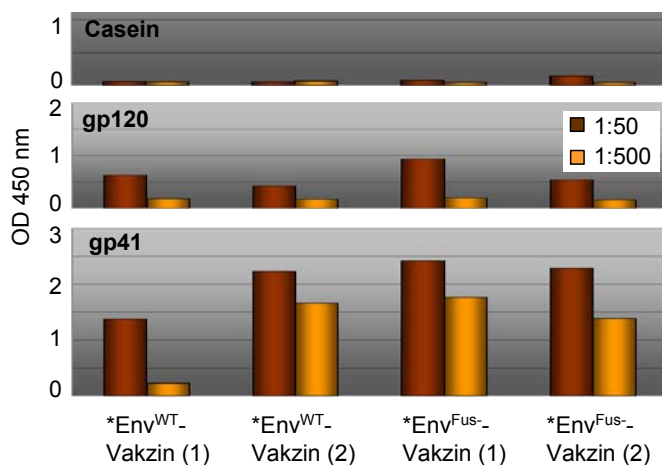


Abb. 4.14: gp120- und gp41-Antikörper-ELISA mit Seren immunisierter Mäuse.

Die Seren von Mäusen, die mit den in der Grafik angegebenen Präparationen immunisiert wurden, sind in 1:50- und 1:500-Verdünnungen in einem ELISA auf Casein (oben), gp120- (Mitte) und gp41-Protein (unten) analysiert worden. * symbolisiert dabei die Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein.

Wie in Abb. 4.14 dargestellt, lagen die gp120- und gp41-Antikörpertiter aller vier Tiere deutlich über dem Signal des Serums gegen gebundenes Casein. Allerdings waren die Werte, zumindest für gp120, trotz der Verwendung des gereinigten rekombinanten Proteins für die Vorimmunisierung noch relativ gering. Die Serumtiter von Tieren, die parallel mit Negativkontrollen immunisiert wurden (CD4/X4-PV und Vesikel), lagen für gp120 geringfügig unterhalb, und für gp41 deutlich unterhalb der dargestellten Werte (Daten nicht gezeigt). Die

niedrigen Antikörpertiter gegen gp120 wurden auch in den Seren weiterer Mäuse, die mit in Insektenzellen produziertem gp120-Protein vorimmunisiert wurden, gefunden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurde in späteren Versuchen (siehe 4.7) eine Vorimmunisierung mit gp120-Protein aus Insekten- und CHO-Zellen durchgeführt.

4.6.2 Herstellung und Charakterisierung muriner monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1-Env-Protein

Wie unter 3.7.3.1 und 4.6 beschrieben, wurden Mäuse drei Tage vor der Milzentnahme intravenös mit PV-Vakzin immunisiert. Damit aus allen vier Tieren nacheinander die zeit- und arbeitsaufwendige Milzfusion mit den anschließenden Subklonierungen durchgeführt werden konnte, wurde diese letzte intravenöse Immunisierung der einzelnen Tiere jeweils im Abstand von einigen Tagen durchgeführt. Etwa acht Tage nach der Milzfusion wurden die Hybridomzellkulturüberstände auf ihre Produktion von gp120- und gp41-Antikörpern mittels ELISA untersucht. Bei Zellfusion I wurde die Milz der Maus *Env^{Fus}-Vakzin (1), bei Zellfusion II die Milz der Maus *Env^{WT}-Vakzin (2), für Zellfusion I^B die Milz der Maus *Env^{Fus}-Vakzin (2) und für Zellfusion II^B die Milz der Maus *Env^{WT}-Vakzin (1), verwendet. Die Ziffern (I, II, I^B, II^B) in der Nomenklatur der generierten Hybridome und Antikörper (siehe unten) bezeichnen das jeweilige Tier beziehungsweise die jeweilige Fusion, von der die entsprechenden Klone oder Antikörper stammen.

In Abb. 4.15 werden repräsentative 96well-ELISA-Platten des ersten *Screenings* nach gp120 und gp41-spezifischen Antikörpern oder CA-spezifischen Antikörpern im Überstand derselben generierten Hybridomzellkulturüberstände der Zellfusion I dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass im Gegensatz zu den bisherigen Versuchen eine relativ große Anzahl von Klonen Env-spezifische Antikörper produzierte, die im ELISA nachweisbar waren, und dass zudem keine Env/CA-doppelpositiven Signale auftraten, was die Möglichkeit einer unspezifischen Reaktivität unwahrscheinlich macht.

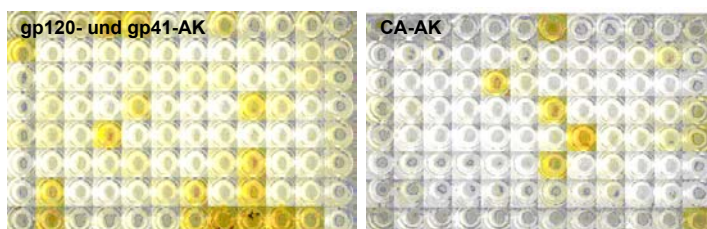


Abb. 4.15: Erstes Screening nach monoklonalen gp120- und gp41-spezifischen bzw. CA-spezifischen Antikörpern (AK) in den Zellkulturüberständen generierter Hybridomzellen.

Gezeigt sind repräsentative 96well-ELISA-Platten des ersten *Screenings* acht Tage nach der Zellfusion I. Das linke Bild zeigt eine ELISA-Platte, die mit einer Mischung von gp120- und gp41-Protein beschichtet wurde. Auf der rechten Platte wurde CA-Protein gebunden. Die gelben *Wells* repräsentieren Zellklone, die entsprechende Antikörper in den getesteten Zellkulturüberstand sezerniert haben. Dabei handelt es sich jeweils bei beiden Platten um die Zellkulturüberstände identischer Hybridomklone.

Im Einzelnen wurden für die Fusionen I / II / I^B / II^B 900 / 1300 / 1400 / 1300 Zellkultur-überstände untersucht. 83 / 34 / 100 / 20 Env-spezifische Klone mit im gp120/41-Antikörper-ELISA erreichten ODs zwischen 0,3-2,1 / 0,2-2,2 / 0,2-2,4 / 0,2-0,3 (bei einem Hintergrund von 0,06) wurden dabei identifiziert.

Bei den Zellfusionen I und I^B (*Env^{Fus}-Vakzin) wurden deutlich mehr Env-spezifische Zellklone mit erheblich stärkeren Signalen generiert als bei den Fusionen II und II^B (*Env^{WT}-Vakzin).

Außer den untersuchten Env-Antikörpern wurden für die Fusionen I / II / I^B / II^B aus jeweils 200 untersuchten Zellkulturüberständen 5 / 11 / 15 / 5 CA-spezifische Klone mit ODs zwischen 0,7-1,4 / 0,7-2,1 / 0,3-1,3 / 0,3-1,8 identifiziert. In diesem Fall konnte kein Effekt des Glutaraldehyds auf die Immunantwort festgestellt werden.

Die 203 Env-spezifischen Zellkulturüberstände der Fusionen I, I^B und II^B dieses ersten Screenings (Fusion II aufgrund strategischer Überlegungen nicht analysiert) wurden auch parallel auf ihre Fähigkeit zur Neutralisation des Virus pNL4-3^{BH10} (Details zum Neutralisationstest siehe unten und unter 3.4.3) getestet. Keiner der Env-spezifischen Zellkulturüberstände war neutralisierend, während ein 1:10 verdünnter H902-Zellkulturüberstand, der neutralisierende monoklonale Antikörper gegen die V3-Domäne enthält, das Virus vollständig neutralisierte. Die fehlende Neutralisation der Hybridomüberstände könnte das Ergebnis einer zu geringen Antikörperkonzentration in den Überständen der Klongemische sein. Deshalb wurden die Hybridomzellen der stark bindenden Env-spezifischen Zellkulturüberstände subkloniert. Obwohl über 70% der ursprünglich identifizierten Env-spezifischen Hybridomklone während der Subklonierungsschritte ihre Env-Antikörperproduktion einstellten (mittels gp120/41-Antikörper-ELISA analysiert), gelang es, nach zwei bis vier Subklonierungen insgesamt zehn gp120-, drei gp41- und, als Kontrolle, drei CA-spezifische Hybridome zu generieren, deren unverdünnte Überstände OD 450 nm-Werte im ELISA von $\geq 0,5$ zeigten. Die einzelnen Hybridomzellen wurden bis zur völligen Konfluenz kultiviert. Der Überstand wurde dann (1) auf seine Virusneutralisation getestet. (2) Die Menge an IgG in den Zellkulturüberständen wurde durch eine Protein-G-Affinitätsaufreinigung untersucht. (3) Die Bindungstitern der Antikörper wurden in einem ELISA gegen gebundenes gp120-, gp41- oder CA-Protein (siehe 3.6.9) ermittelt. Die eventuelle Positivität der Antikörper wurde in einer indirekten Immunfluoreszenz mit Env-exprimierenden Zellen (4) und in einer Western-Blot-Analyse (5) gegen mittels SDS-PAGE aufgetrenntes gp120- oder gp41-Protein analysiert.

(1) Neutralisation:

Die Überstände der generierten konfluenten Hybridomzellen und Kontrollen wurden in vier Konzentrationen von 10 bis 0,01 µg/ml auf ihr Neutralisationsvermögen gegenüber dem

homologen Virus pNL4-3^{BH10} getestet. Dabei wurde die Menge an IgG in unverdünnten Hybridomzellkulturüberständen auf ca. 10 µg/ml geschätzt. Die Bezeichnung homologes Virus bezieht sich auf die Aminosäuresequenz des Env-Proteins im PV-Vakzin und des rekombinanten gp120- und gp41-Proteins der Vorimmunisierung. Diese Proteine stammen, genau wie das Env-Glykoprotein des HIV-Isolats pNL4-3^{BH10}, von dem Laborisolat BH10 (PV-Vakzin) oder sind mit diesem annähernd identisch (rekombinantes gp120- bzw. gp41-Protein des Stamms IIIB bzw. HXB2).

Antikörpervedünnungen wurden mit dem Virus gemischt und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. 36 Stunden nach der Infektion von TZM-bl-Zellen wurden die Glutaraldehyd/Formaldehyd-fixierten TZM-bl-Zellen mit X-Gal-Lösung gefärbt und die blauen Zellen unter einem Durchlichtmikroskop gezählt (siehe Abb. 4.16).

Bei den Positivkontrollen handelte es sich um folgende Antikörper:

4G10 und H902: Überstände von murinen Hybridomzellen, deren monoklonale Antikörper die V3-Domäne von gp120 binden und neutralisierend gegen homologe Viren wirken.

b12: Aufgereinigter humaner monoklonaler Antikörper. Er ist kreuzneutralisierend gegen unterschiedliche HIV-Isolate und bindet an ein Env-Epitop, das mit der CD4-Bindungsstelle überlappt.

2G12: Aufgereinigter humaner monoklonaler Antikörper, ebenfalls kreuzneutralisierend gegen viele Virusisolate. Er erkennt ein Mannose-assoziiertes Epitop des gp120-Proteins.

2F5: Aufgereinigter humaner monoklonaler Antikörper, der ebenfalls kreuzneutralisierend gegen viele Virusisolate wirkt. Er erkennt ein Epitop in der Ektodomäne von gp41.

CG10: Überstand muriner Hybridomzellen, deren monoklonale Antikörper gegen ein CD4-induziertes Epitop von gp120 gerichtet sind. Neutralisierend.

Sim2/Sim4: Ein Gemisch von Überständen der murinen Hybridomzellen Sim2 und Sim4, deren Antikörper unterschiedliche Epitope des HIV-Rezeptors CD4 erkennen und eine HIV-Infektion inhibieren.

Als Negativkontrolle diente der Überstand von EGFR-Hybridomzellen, deren Antikörper ein für diesen Ansatz irrelevantes Epitop des *epidermal growth factor receptor* erkennen.

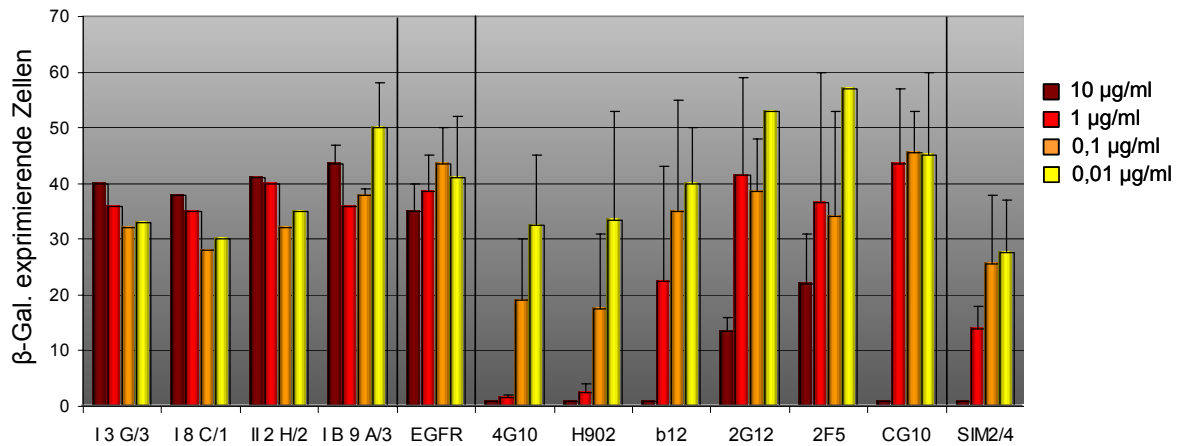


Abb. 4.16: Neutralisation des Virus pNL4-3^{BH10} mit generierten murinen Hybridomzellkultur-überständen und Kontrollantikörpern.

Gezeigt sind Neutralisationsversuche mit vier repräsentativen Überständen der generierten murinen Hybridome sowie von charakterisierten Kontrollantikörpern (detaillierte Beschreibung im Text). Die Anzahl der eingesetzten infektiösen Einheiten (IU) von pNL4-3^{BH10} beträgt 40. Die Antikörper wurden in den Konzentrationen 10-0,01 µg/ml eingesetzt. Zur Auswertung wurden 24 Stunden nach der Infektion die β-Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert der erhaltenen Daten aus zwei Experimenten dar; der Fehlerbalken ergibt sich aus der Standardabweichung der Werte. Die Ergebnisse der ersten drei Säulengruppen stammen aus einem einzelnen Experiment.

Die Abb. 4.16 zeigt die relevanten Ergebnisse zweier unabhängiger Neutralisationsexperimente mit den oben beschriebenen Antikörperkontrollen sowie vier generierten Hybridomen in verschiedenen Antikörperkonzentrationen. Es ist deutlich erkennbar, dass sämtliche Antikörper der Positivkontrollen das Virus in unterschiedlichen Effizienzen neutralisieren können. Neutralisationskapazitäten von Viren wurde schon für 4G10 (von Brunn *et al.*, 1993), für H902 (Chesebro *et al.*, 1988), für b12, 2G12, 2F5 (Binley *et al.*, 2004) und für CG10 (Sullivan *et al.*, 1998) gezeigt. Während Sim2/Sim4 durch Bindung an den zellulären Rezeptor CD4 die HIV-Infektion inhibiert (Mizukami *et al.*, 1988) zeigte der α-EGFR-Hybridomüberstand keine Neutralisation. Ebenfalls keine Neutralisation zeigten sämtliche Überstände der generierten Hybridome. Als repräsentative Auswahl aller generierten Hybridome werden in Abb. 4.16 ein im ELISA schwach bindender gp120-Antikörper (II 2 H/2), die zwei am stärksten bindenden gp120-Antikörper (I 3 G/3, I 8 C/1) sowie der am stärksten bindende gp41-Antikörper (I B 9 A/3) (siehe Abb. 4.18) dargestellt.

(2) Menge an IgG:

Um sicherzugehen, dass die Mengen an Immunglobulinen in den hergestellten Hybridomüberständen mit den Mengen an Immunglobulinen in Zellkulturüberständen von Positivkontrollen (z.B. H902) vergleichbar waren und dass folglich nicht die geringere IgG-Menge in den hergestellten Hybridomzellkulturüberständen die Ursache für die fehlende Neutralisation war, wurde die Menge an IgG in allen Hybridomüberständen untersucht.

1 ml des jeweiligen Hybridomzellkulturüberstands wurde mit Protein-G-Sepharose-Kügelchen (*beads*) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Kügelchen mit gebundenen Antikörpern wurden gewaschen und anschließend in einen PAGE-Probenpuffer aufgenommen. Abb. 4.17 zeigt eine Coomassie-Blau-Färbung eines Gels, auf dem die IgG-Fractionen der gleichen generierten Hybridome, die auch auf ihr Neutralisationsvermögen hin analysiert und deren Ergebnisse in Abb. 4.16 dargestellt wurden, gezeigt sind. Als Positivkontrollen wurden gereinigte 2F5-Antikörper und H902-Überstand und als Negativkontrolle RPMI^k-Medium analysiert.

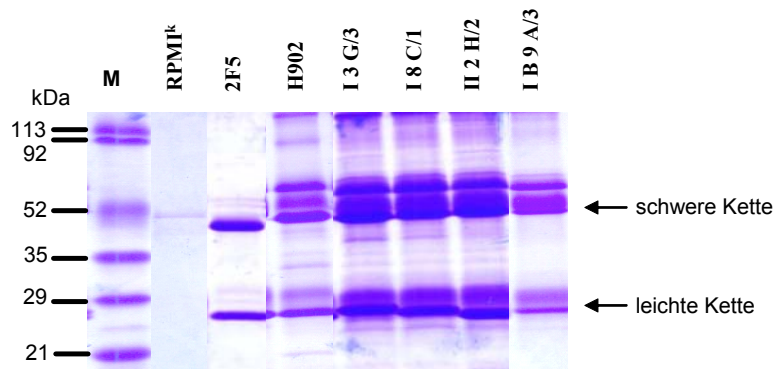


Abb. 4.17: Analyse der IgG-Menge in generierten murinen Hybridomzellkulturüberständen.

Gezeigt ist die IgG-Menge von jeweils 1 ml Hybridomüberstand, der mit Protein G affinitätsaufgereinigt wurde. Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Die schweren und die leichten Ketten der affinitätsaufgereinigten Antikörper erscheinen (mit zusätzlichen Banden in der Höhe der schweren und leichten Ketten) in allen Hybridomzellkulturüberständen. Als Negativkontrolle wurde RPMI^k-Medium und als Positivkontrolle wurden 10 µg gereinigter 2F5-Antikörper und 1 ml H902-Hybridomzellkulturüberstand mit Protein G gefällt. M = Marker.

Die schweren und die leichten Ketten der Immunglobuline zeigen Banden, welche der erwarteten molekularen Größe entsprechen. Deren Intensität und somit die Menge an Proteinen sind in allen Proben in einer vergleichbaren Größenordnung. Die RPMI^k-Kontrolle weist keine Banden in entsprechender Höhe auf. In allen Hybridomüberständen erscheinen neben den oben beschriebenen IgG-Banden weitere Banden etwas oberhalb der Banden der leichten und schweren Ketten, deren Zusammensetzung nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Es könnte sich um Proteine handeln, die unspezifisch an die Antikörper gebunden haben.

Diese Analyse zeigt, dass es unwahrscheinlich ist, dass eine zu geringe Konzentration an IgG der Grund für die fehlende Neutralisationsaktivität der Hybridomzellkulturüberstände war, da in allen Fällen die IgG-Banden der Intensität der IgG-Banden der Positivkontrolle 2F5 entsprechen, bei der 10 µg gereinigtes IgG an Protein G gebunden wurden.

(3) Bindungstiter:

Obwohl die generierten monoklonalen Antikörper nicht in der Lage waren, homologes Virus zu neutralisieren, sollten sie weiter charakterisiert werden. Es sollte geklärt werden, ob

gegebenenfalls ausschließlich Antikörper mit schwacher Bindungsaktivität gewonnen wurden, was die nicht vorhandene Neutralisation eventuell erklären könnte.

Verschiedene Verdünnungen der Überstände der zehn gp120-, drei gp41- und, als Kontrolle, der drei CA-spezifischen konfluent gewachsenen Hybridome wurden in einem ELISA gegen gebundenes gp120- (siehe Abb. 4.18, oben), gp41- (Mitte), oder CA-Protein (unten) analysiert (siehe 3.6.9). Die Positivkontrollen waren:

1. Überstand des murinen Hybridoms H902 (α -gp120).
2. Der monoklonale Antikörper 2F5 (α -gp41).
3. Überstand des murinen Hybridoms Mab 183 (α -CA).

Als Negativkontrolle diente der Überstand des Hybridomklons EGFR.

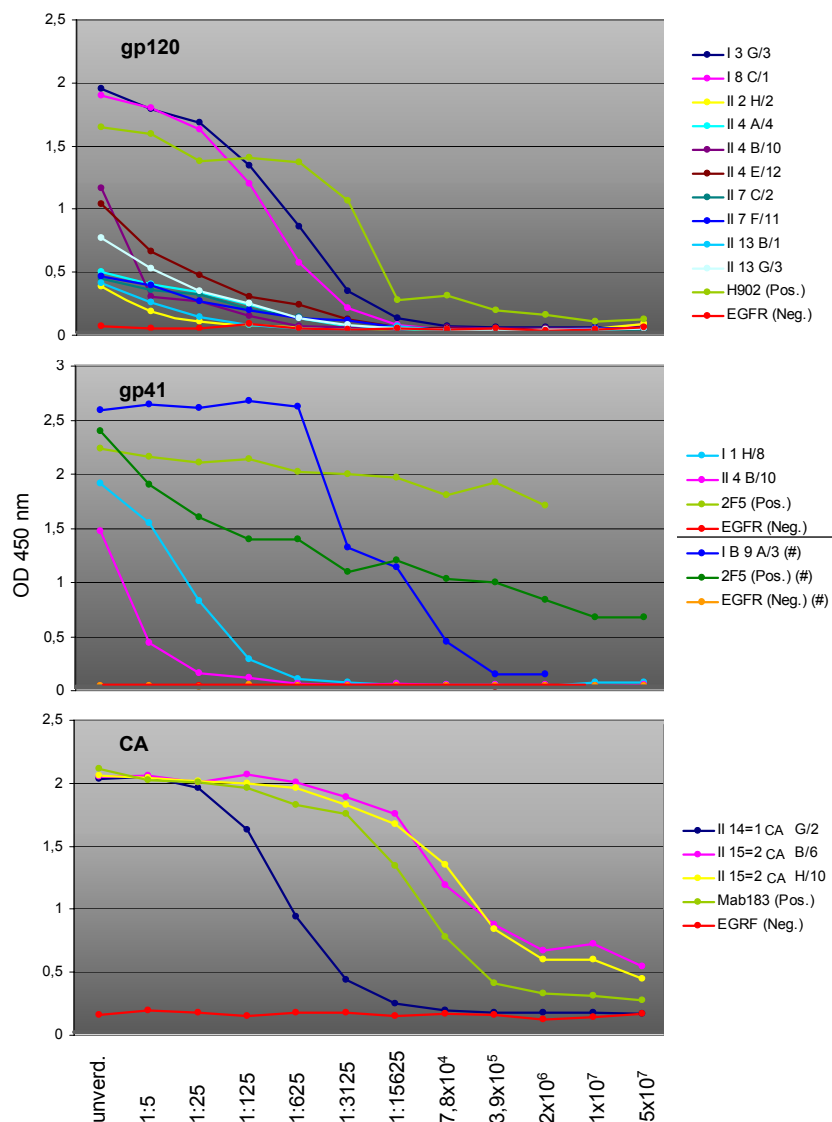


Abb. 4.18: gp120- (oben), gp41- (Mitte) und CA- (unten) Antikörpertiter in Zellkulturüberständen der generierten murinen Hybridome im Vergleich zu Kontrollantikörpern.

Gezeigt sind die Messwerte eines gp120-, gp41- und CA-Antikörper-ELISAs von verschiedenen Verdünnungen des Überstands der generierten Maushybridome und der Kontrollantikörper. In der mittleren Darstellung der gp41-Titration sind aus Gründen der Übersichtlichkeit zwei unabhängige Experimente in einer Grafik vereint und durch ein # zu unterscheiden. Die unverdünnte Konzentration entspricht bei allen Antikörpern etwa 10 μ g/ml. Es sind Einzelmessungen des ELISAs dargestellt.

In Abb. 4.18 ist erkennbar, dass zwei gp120-spezifische (I 3 G/3, I 8 C/1), ein gp41-spezifischer (I B 9 A/3) und alle drei CA-spezifische Antikörper hohe Bindungstitern zeigen, die mit den Positivkontrollen vergleichbar waren. Die restlichen Überstände generierter Hybridome zeigten geringere Bindungstitern. Das bedeutet, dass von den zahlreichen ursprünglich identifizierten Env-Hybridomen nur drei stark bindende Antikörper produzierten. In diesen Fällen war also trotz der hohen Bindungstitern keine Neutralisation nachweisbar.

(4) Immunfluoreszenz:

Die Überstände der Hybridomzellen wurden auch in der indirekten Immunfluoreszenz von fixierten und permeabilisierten HIV-Env-exprimierenden 293T-Zellen untersucht. Positive Signale traten ausschließlich bei den stark bindenden, gp120-spezifischen (I 3 G/3, I 8 C/1), gp41-spezifischen (I B 9 A/3) (siehe Abb. 4.19) und bei allen drei CA-spezifischen Antikörpern (nicht gezeigt) auf (jeweils unverdünnte Hybridomüberstände). Als Positivkontrollen dienten die unverdünnten Überstände der Hybridome H902 (gp120 Mab) und Chessie 8 (gp41 Mab). Es sind sowohl positive als auch negative Zellen zu sehen. Die Transfektionseffizienz der 293T-Zellen entsprach etwa 50%.

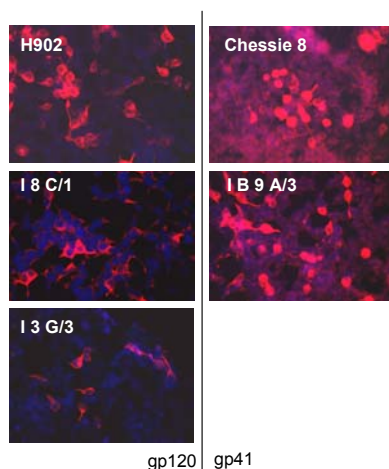


Abb. 4.19: Indirekte Immunfluoreszenz mit den Überständen einiger generierter Maus-Hybridome und Kontrollen (H902 und Chessie 8).

Gezeigt ist eine indirekte Immunfluoreszenz-Analyse von Env-exprimierenden 293T-Zellen mit den in der Grafik bezeichneten unverdünnten Zellkulturüberständen. Als Positivkontrollen dienten unverdünnte Überstände der Hybridome H902 und Chessie 8.

(5) Western-Blot-Analyse:

Die Hybridomüberstände wurden auch in Western-Blot-Analysen auf ihre Bindungsfähigkeit von jeweils 100 ng des elektrophoretisch aufgetrennten, gereinigten gp120- bzw. gp41-Proteins hin untersucht. Die zwei gp120-spezifischen Antikörper (I 3 G/3, I 8 C/1) sowie der gp41-spezifische (I B 9 A/3) Antikörper, die in der indirekten Immunfluoreszenz positiv waren, konnten auch im Western Blot ebenfalls spezifisch gp120- und gp41-Protein detektieren, allerdings sehr schwach (nicht gezeigt). Die drei generierten monoklonalen CA-

Antikörper (II 14=1 p24 G/2, II 15=2 p24 B/6, II 15=2 p24 H/10) waren in Western-Blot-Analysen sowohl gegen 100 ng CA-Protein als auch gegen ein Zelllysat CA-exprimierender 293T-Zellen stark positiv (nicht gezeigt).

4.7 Immunisierungen in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten

Nach Immunisierungen wurden mit dem PV-Vakzin von für humanes CD4 (huCD4) und humanes CXCR-4 (huCXCR-4) nicht transgenen Mäusen möglicherweise auch Antikörper gegen huCD4 und huCXCR-4 induziert. Diese Antikörper inhibieren Infektionen von HIV-1 und verhindern dadurch eine sinnvolle Analyse der Env-spezifischen Neutralisationsaktivität der murinen Seren. huCD4 und huCXCR-4 transgene Ratten, welche von O. Keppler, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt wurden, sind indessen tolerant gegen huCD4 und huCXCR-4 und stellen somit ein optimales Versuchstier dar. Sie entsprechen weitgehend den bereits veröffentlichten huCD4/huCCR5 transgenen Tieren (Keppler *et al.*, 2002), wobei die in dieser Arbeit verwendeten Tiere für CXCR-4 statt für CCR5 positiv waren. Dabei wurden die PBMCs der gezüchteten Ratten vor der Verwendung in FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Experimenten auf ihre Expression von huCD4 und huCXCR-4 hin untersucht. Mit diesen mit PV-Vakzin immunisierten Tieren bot sich erstmalig die Möglichkeit, HIV-1-Neutralisationstests direkt mit Seren der Tiere durchzuführen. Ein weiterer Vorteil war, dass durch die Körpergröße der Ratten größere Volumen an Serum pro Tier im Vergleich zur Maus gewonnen werden konnten, was somit eine IgG-Affinitätsaufreinigung aus diesen Seren ermöglichte (siehe 3.9.2).

Eine Übersicht über die den huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten verabreichten Präparationen ist in Tabelle 4.2 dargestellt. Darüber hinaus wird eine Zusammenfassung der in 4.7.1.1 analysierten gp120- und gp41-Antikörpertiter gegeben.

Tabelle 4.2: Immunisierungsschema und Immunantwort in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten.

(1) # intern	(2) Name	(3) <i>prime</i> (mit Adjuvans)	(4) <i>boosts</i> (ohne Adjuvans)	(5a) gp120- Titer	(5b) gp41- Titer
5	Präserum Ratte 5	-	-	-	-
3	*gp120/41 (1)	gp120- und gp41- Protein	gp120- und gp41- Protein	++	++
4	*gp120/41 (2)	gp120- und gp41- Protein	gp120- und gp41- Protein	++	++
5	*Env ^{Fus} -Vakzin (1)	gp120- und gp41- Protein	Env ^{Fus} -Vakzin	++	++
6	*Env ^{Fus} -Vakzin (2)	gp120- und gp41- Protein	Env ^{Fus} -Vakzin	-	++
7	Env ^{Fus} -Vakzin (1)	Env ^{Fus} -Vakzin	Env ^{Fus} -Vakzin	(+)	(+)
8	Env ^{Fus} -Vakzin (2)	Env ^{Fus} -Vakzin	Env ^{Fus} -Vakzin	(+)	+
9	*Env ^{Fus} -PV	gp120- und gp41- Protein	Env ^{Fus} -PV	+	++
1	*CD4/X4-PV	gp120- und gp41- Protein	CD4/X4-PV	+	++
2	*PBS	gp120- und gp41- Protein	PBS	+	++

(1) Interne Nummerierung der immunisierten Tiere.

(2) Bezeichnung der immunisierten Tiere aufgrund der verabreichten Antigene. Ein * bezeichnet die Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein. Die Zahlen in Klammern unterscheiden die zwei Ratten pro Immunisierung eines Präparats.

(3) Subkutan applizierte Präparationen für die erste Immunisierung in Freund's komplettem Adjuvans (*prime*). Es wurden je 30 µg gp120- (aus Insekten- und CHO-Zellen) und gp41-Protein (aus Hefe) oder 60 µg Env^{Fus}-Vakzin immunisiert.

(4) Applizierte Präparationen für die *boosts* ohne Adjuvans. Zwei *boosts* in den Wochen drei und fünf nach dem *prime* erfolgten intraperitoneal und der letzte *boost* sieben Wochen nach dem *prime* intravenös. Es wurden 20 µg gp120/41-Protein, 20 µg Env^{Fus}-Vakzin, 20 µg CD4/X4-PV, 10 µg Env^{Fus}-PV (CA) oder PBS immunisiert.

(5a, b) Zusammengefasste Ergebnisse der unter 4.7.1 beschriebenen, näher analysierten gp120 (a)- und gp41 (b)-Bindungstiter: - negativ, (+) sehr schwach, + mäßig, ++ stark.

Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse aus den vorhergehenden Immunisierungsexperimenten in Mäusen sollten in diesem Immunisierungsexperiment nun PV-Präparationen verwendet werden, die in Zell-*Factories* produziert wurden. Diese reinen Pseudovirionen sollten aufgrund ihrer nur geringen Kontaminationen mit nicht viralen Proteinen keine unspezifischen Immunantworten induzieren. In früheren Experimenten (siehe 4.5.2 und 4.6.2) wurde gezeigt, dass Env-spezifische Hybridomzellen nur nach Immunisierungen nach dem alternativen Protokoll (gp120/gp41-Protein-*prime* und PV-Vakzin-*boosts*, siehe 4.6) erzeugt werden konnten. Aus diesem Grunde wurden sieben der neun Ratten mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert. Im Gegensatz zu dem unter 4.6 beschriebenen Experiment wurde jetzt allerdings ein Gemisch von gp120-

Proteinen aus Insekten- und CHO-Zellen verwendet, da die induzierten Antikörpertiter nach Immunisierungen mit gp120-Protein aus Insektenzellen sehr gering waren. Das verwendete gp41-Protein wurde in Hefezellen hergestellt. Die zwei übrigen Ratten wurden ausschließlich mit dem Env^{Fus}-Vakzin (Ratte 7 und 8) immunisiert. Zwei Ratten wurden sowohl mit gp120/41-Protein vorimmunisiert als auch mit gp120- und gp41-Protein *geboostet* (Ratten 3 und 4) und dienten somit als Positivkontrolle. Die Ratten 1 und 2, die nach der gp120/41-Vorimmunisierung entweder mit CD4/X4-PV allein bzw. mit PBS *geboostet* wurden, dienten als Negativkontrolle bei den Neutralisationsexperimenten. Bei diesen Tieren wurde nach der einmaligen Immunisierung mit rekombinantem Env-Protein kein oder nur ein schwacher Neutralisationstiter gegen homologes Virus erwartet. Eine weitere Kontrolle waren *boosts* mit Env^{Fus}-PV allein nach Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein. Dieses Tier (Ratte 9) wurde somit mit derselben Menge an Env in Pseudovirionen *geboostet* wie die *Env^{Fus}-Vakzin-Tiere (Ratten 5 und 6), allerdings mit anderen Env-Konformationen. Mit diesen Kontrollseren sollte das Neutralisationsvermögen der Seren der Ratten 5 und 6, welche eine gp120/41-Vorimmunisierung und Env^{Fus}-Vakzin-*boosts* erhalten hatten, verglichen werden. Außerdem wurden aus den Milzen dieser Ratten Hybridomzellen hergestellt.

4.7.1 Analyse der Seren

Die Seren der in Tab. 4.2 angegebenen immunisierten Ratten wurden jeweils in einem gp120-, gp41-, CA- und BSA-ELISA (siehe 3.6.9) auf ihr Bindungsreaktivität und in einem Neutralisationstest (siehe 3.4.3) auf ihr Neutralisationsvermögen analysiert.

4.7.1.1 Analyse der gp120-, gp41-, CA- und BSA-Bindungstiter in Seren

Zur Analyse der gp120-, gp41-, CA- und BSA-Bindungstiter wurden verschiedene Verdünnungen (1:20 bis 1:20000) der Rattenserum in einem ELISA auf das Vorhandensein von gp120-, gp41-, CA- bzw. BSA-Antikörpern getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.20 grafisch dargestellt.

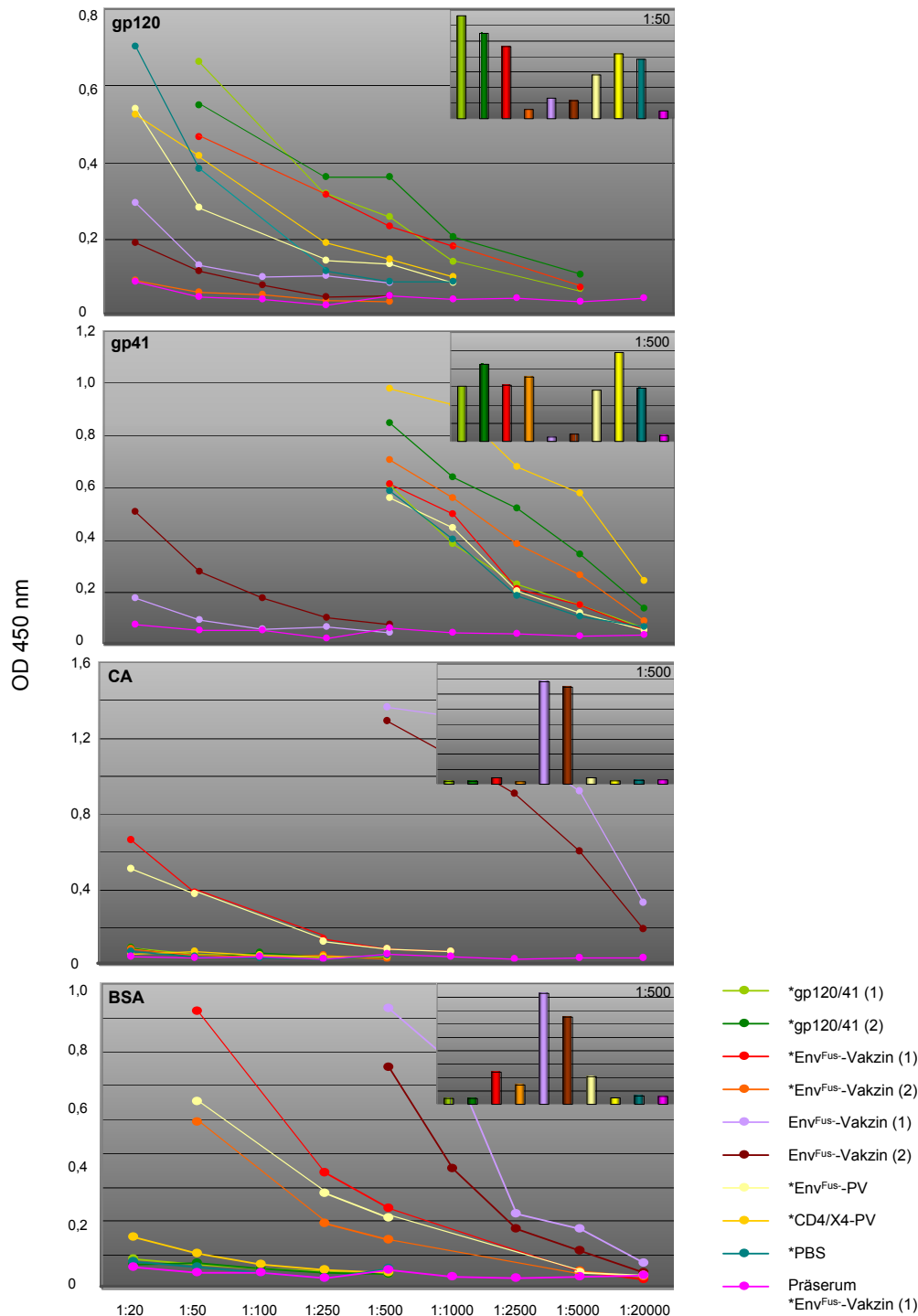


Abb. 4.20: Analyse der gp120-, gp41-, CA- und BSA-Titer von Rattenserum mittels Antikörper-ELISA.

Gezeigt sind die Messwerte eines gp120 (oben)-, gp41 (Mitte 1)-, CA (Mitte 2)- und BSA (unten)-Antikörper-ELISAs von Rattenserum in den Verdünnungen 1:20-1:20000. Die Zahlen in Klammern unterscheiden die zwei Ratten pro Immunisierung eines Präparats. Dabei signalisiert * eine Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein. Der Hintergrund der Messung ist durch die Analyse des Präserums von Tier *Env^{FUS}-Vakzin (1) gegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden im oberen Teil der Grafiken zusätzlich die entsprechenden Bindungstitern der zehn Seren für die Verdünnungen 1:50 (gp120) oder 1:500 (gp41, CA, BSA) in einem Balkendiagramm dargestellt. Die genauen Definitionen der immunisierten Präparationen sind in Tabelle 4.2 beschrieben.

gp120-Titer:

Sieben der neun immunisierten Tiere haben eine Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein erhalten (mit * markiert). Mit einer Ausnahme (*Env^{Fus}-Vakzin (2)) waren die gp120-Antikörpertiter im Serum dieser Tiere deutlich positiv. Die gp120-Antikörpertiter in den zwei Tieren, die ausschließlich Env^{Fus}-Vakzininjektionen ohne eine gp120- und gp41-Protein-Vorimmunisierung bekamen, waren deutlich geringer und lagen nur bei der 1:20-Verdünnungen knapp über dem Hintergrund. Somit zeigt auch dieses Experiment die schwache Immunogenität der PV-Vakzinpräparationen ohne eine gp120/41-Vorimmunisierung.

gp41-Titer:

Sämtliche Seren von Tieren, die mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert wurden, zeigten hohe Bindungstiter im ELISA.

Die Seren der Tieren, die ausschließlich mit Env^{Fus}-Vakzin ohne Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein immunisiert wurden, zeigten auch hier nur einen geringen gp41-Antikörpertiter.

Die gp120- und gp41-Titer der Tiere, die mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert wurden, konnten durch *boosts* mit Env^{Fus}-PV, Env^{Fus}-Vakzin oder durch rekombinantes gp120/41-Protein nicht signifikant erhöht werden. So war zum Beispiel der gp41-Titer des Tieres, das mit CD4/X4-PV *geboostet* wurde (*CD4/X4-PV), im Vergleich zu den gp41-Titern der übrigen Rattenserum am höchsten.

CA und BSA-Titer:

Ausschließlich die Tiere, die mit PV-Vakzin in Freund's komplettem Adjuvans immunisiert wurden (ohne eine gp120/41-Vorimmunisierung) (Env^{Fus}-Vakzin (1) und (2)), zeigten hohe CA- (und BSA-) Antikörpertiter. Signifikant aber sehr viel niedriger waren die CA- und BSA-Antikörpertiter in den Tieren *Env^{Fus}-PV und *Env^{Fus}-Vakzin (1). Die CA- und BSA-Titer der Seren der Tiere, die keine PV-Immunisierung erhalten hatten (*gp120/41 (1) und (2) und *PBS), waren negativ. Das Serum von Tier *Env^{Fus}-Vakzin (2) war für BSA-Antikörper positiv, wobei CA-Antikörper fehlten. Das Serum von Tier *CD4/X4-PV wies keinen CA- und nur einen sehr schwachen BSA-Titer auf. Die niedrigen CA- bzw. BSA-Antikörpertiter in Tier *Env^{Fus}-Vakzin (2) bzw. *CD4/X4-PV sind nicht endgültig geklärt.

4.7.1.2 Analyse des Neutralisationsvermögens von Seren immunisierter Ratten

Wie schon unter 4.7 angesprochen ist es mit den Seren der immunisierten huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten möglich, Neutralisationstests direkt durchzuführen (siehe Abb. 4.21).

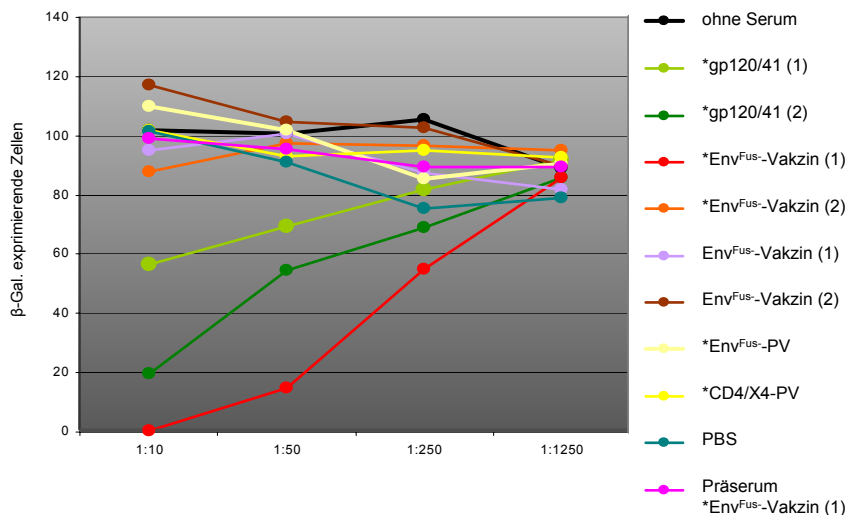


Abb. 4.21: Neutralisation des Virus pNL4-3^{BH10} mit verschiedenen Rattenserum.

Gezeigt sind die Neutralisations- bzw. Inhibitionseffizienzen verschiedener Rattenserum (siehe auch Abb. 4.22 und Abb. 4.23). Die Anzahl der verwendeten infektiösen Einheiten beträgt 100. Die Seren wurden in verschiedenen Verdünnungen mit pNL4-3^{BH10} gemischt. Zur Auswertung wurden die β -Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten eines Experiments gezeigt.

Wie in der Abb. 4.21 zu sehen ist, waren nur drei Seren der immunisierten Ratten in der Lage, homologes Virus (pNL4-3^{BH10}) zu neutralisieren. Dabei handelt es sich um die Seren der zwei Positivkontrollen (*gp120/41 (1) und (2)) und das Serum der Ratte 5 (*Env^{FUS}-Vakzin (1)). In letzterem Fall war die beobachtete Neutralisation sogar stärker als die der Positivkontrollen. Das Serum der Ratte 6 (*Env^{FUS}-Vakzin (2)) neutralisierte nicht, was sich vermutlich mit dem Fehlen des gp120-Antikörpertiters erklären lässt.

Im nächsten Schritt sollten die Seren auf eine mögliche Neutralisation einer begrenzten Anzahl von heterologen Viren getestet werden. Dazu wurden die zwei T-tropen HIV-1-Primärisolate J27 und J130 gewählt. Alle Rattenserum und die Negativkontrollen NRS (*normal rat serum*) wurden in einer 1:10-Verdünnung in einem Neutralisationstest mit 100 infektiösen Einheiten (IU) von pNL4-3^{BH10}, 40 IU J27 und 40 IU J130 untersucht. Bei NRS handelte es sich um ein Serumgemisch verschiedener nicht immunisierter Ratten. Dieses zusätzliche Kontrollserum wurde verwendet, weil in Neutralisationsexperimenten mit murinen Seren die Mehrzahl der Serumproben (auch von nicht immunisierten Tieren) unspezifisch Virusinfektiosität inhibierte (Daten nicht gezeigt). Abb. 4.22 zeigt die Analyse des

Neutralisationsvermögens verschiedener Rattenserum gegenüber homologen und heterologen Viren. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse der nicht neutralisierenden Seren nicht dargestellt.

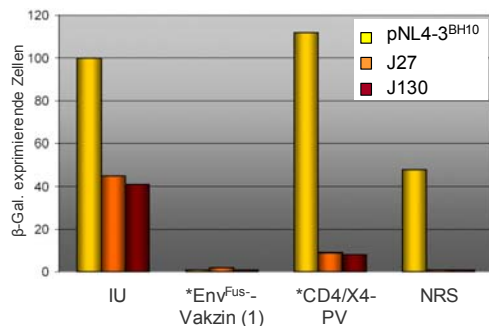


Abb. 4.22: Neutralisation bzw. Inhibition von pNL4-3^{BH10}-, J27- und J130-Infektionen durch verschiedene Rattenserum.

Gezeigt sind Inhibitionseffizienzen von Rattenserum (*Env^{Fus-}-Vakzin (1), *CD4/X4-PV und NRS), die eine zum Teil unspezifische Inhibition gegen homologes und/oder heterologes Virus zeigten (aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse der nicht neutralisierenden/inhibierenden Seren nicht dargestellt). Die Anzahl der eingesetzten infektiösen Einheiten (IU) beträgt 100 für pNL4-3^{BH10} bzw. 40 für J27 und J130. Die Rattenserum wurden in einer 1:10-Verdünnung mit den Viren gemischt. Zur Auswertung wurden 24 Stunden nach der Infektion die β -Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Es sind Mittelwerte von Duplikaten eines Experiments gezeigt.

Mit einer Ausnahme (*CD4/X4-PV) waren sämtliche Rattenserum, die das homologe Virus nicht neutralisieren konnten, auch nicht in der Lage, die hier analysierten heterologen Viren zu neutralisieren. Die Seren der Ratten, die mit rekombinantem gp120- und gp41-Protein sowohl vorimmunisiert als auch *geboostet* wurden, und die in der Lage waren, homologes Virus zu neutralisieren, konnten die heterologen Viren nicht neutralisieren (nicht gezeigt). Das Serum von Tier *Env^{Fus-}-Vakzin (1) inhibierte sämtliche Infektionen, sowohl des homologen Virus als auch der heterologen Viren. Auch das Serum von Tier *CD4/X4-PV und vor allem das Serumgemisch nicht immunisierter Ratten (NRS) zeigte eine deutliche Inhibition der Infektion durch heterologe Viren. Hierbei war die unspezifische Inhibition durch die Seren der zuletzt genannten Tiere (*CD4/X4-PV und NRS) von heterologen Viren stärker als von homologem Virus, wobei dies derzeit nicht erklärt werden kann. Vor weiteren Analysen musste zuerst dem Phänomen dieser unspezifischen Inhibition nachgegangen werden.

Zunächst wurden dazu VSV-G-pseudotypisierte pNL Δ Env-Viren (pNL Δ Env^{VSVG}-Viren) in einem Neutralisationstest verwendet. VSV-G bindet an zelluläre Oberflächenlipide und vermittelt sehr effizient den endozytotischen Eintritt der adsorbierten Viruspartikel in die Zellen. Antikörper gegen gp120 bzw. gp41 sollen keine spezifische Neutralisation dieser Viren zeigen. pNL Δ Env^{VSVG}-Viren wurden mit den verschiedenen Serumverdünnungen gemischt und die verbleibende Infektiosität der Viren analysiert (siehe Abb. 4.23).

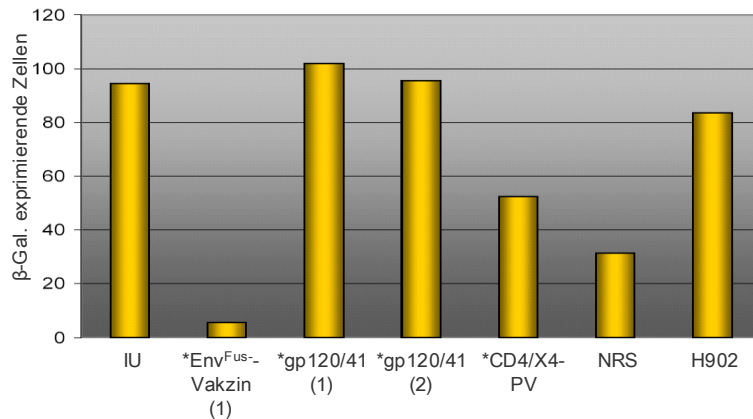


Abb. 4.23: Inhibition von VSV-G-pseudotypisierten pNLΔEnv-Viren durch Rattenserum.

Gezeigt sind die Inhibitionseffizienzen verschiedener Rattenserum (*Env^{Fus}-Vakzin (1), *gp120/41(1), *gp120/41(2), *CD4/X4-PV und NRS). Als Kontrolle wurde der Überstand von H902-Hybridomzellen verwendet. Die Anzahl der eingesetzten infektiösen Einheiten (IU) beträgt 100. Die Rattenserum wurden in einer 1:10-Verdünnung mit den Viren gemischt. Zur Auswertung wurden 24 Stunden nach der Infektion die β-Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten eines Experiments gezeigt.

Analog zum vorhergehenden Experiment (siehe Abb. 4.22) wurden in diesem hier beschriebenen Versuch pNLΔEnv^{VSVG}-Viren unspezifisch von den Seren der Tiere *Env^{Fus}-Vakzin (1), *CD4/X4-PV und von NRS inhibiert. Bei den Seren der Tiere *gp120/41 (1) und (2) und bei H902-Hybridomüberstand, die alle homologes Virus neutralisieren können, wurde erneut keine Inhibition festgestellt. Die Tatsache, dass es in den drei besagten Seren zur Inhibition der pNLΔEnv^{VSVG}-Infektion kam, zeigt, dass eine unspezifische, mit den Neutralisationstests interferierende Inhibitionseffizienz vorhanden war, die es zu beseitigen galt.

4.7.2 Etablierung der IgG-Aufreinigung

Um die unspezifische Inhibitionsaktivität in den Seren von den spezifischen Antikörpern zu trennen, wurden die IgG-Fraktionen der Rattenserum isoliert.

Zur Etablierung der Aufreinigung funktioneller Immunglobuline und um zu zeigen, dass aufgereinigte Antikörper noch Bindungs- und Neutralisationsaktivität besitzen, wurde ein Gemisch von 1,5 ml H902-Hybridomüberstand und 1,5 ml NRS mit PBS auf 20 ml eingestellt (=Überstand) und über eine Protein-G-Säule affinitätsaufgereinigt (siehe 3.9.2). Das H902/NRS-Gemisch wurde zweimal über die Säule gegeben und der Durchfluss gesammelt. Nach einem Waschschrift mit PBS (=Waschfraktion) wurde die IgG-Fraktion mit 0,1 M Glycin-Lösung (pH 3.0) eluiert. Zwölf 1 ml-Fraktionen wurden dabei in Reaktionsgefäßen gesammelt, in die zur Neutralisation des Eluats 50 µl 1 M TRIS (pH 8.0) vorgelegt wurden. Fraktionen zwei bis vier wurden anschließend vereint und über Nacht gegen PBS dialysiert (=Dialysat).

Von sämtlichen Fraktionen der Affinitätsaufreinigung wurden je 15 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie-Blau gefärbt. Als Kontrollen wurden 5 µg 2F5 (gp41-Mab) und ein Proteinmarker (M) auf das Gel aufgetragen (siehe Abb. 4.24).

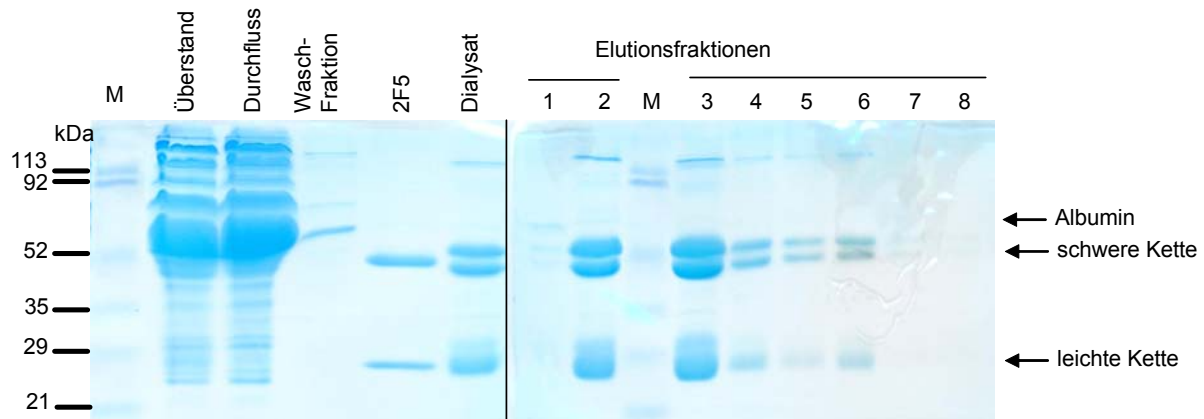


Abb. 4.24: IgG-Affinitätsaufreinigung aus Rattenserum.

Gezeigt sind die Proteinzusammensetzungen der einzelnen Fraktionen nach Aufreinigung von IgG über eine Protein-G-Säule (Erklärungen im Text). Jeweils 15 µl der einzelnen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Die schweren und die leichten Ketten der affinitätsaufgereinigten Antikörper erscheinen (mit einer zusätzlichen Bande auf der Höhe der schweren Ketten) an der erwarteten Position. Die Elutionsfraktionen 2-4 wurden vereint und gegen PBS dialysiert (=Dialysat). 5 µg des gereinigten 2F5-Antikörpers wurden direkt auf das Gel aufgetragen. M = Marker.

Im untersuchten Überstand und im Durchfluss wurden Serumproteine in großer Menge nachgewiesen. Albumin und weitere nicht IgG-Proteine werden durch Protein G nicht gebunden. Die Menge an IgG im Überstand ist zu gering, um deutliche Banden auf Höhe der leichten und schweren IgG-Ketten zu erkennen. Die Waschfraktion enthielt nur geringe Mengen an Albumin und weiteren höhermolekularen Serumproteinen. Von den eluierten Fraktionen enthalten die Fraktionen 2-4 den Hauptanteil (über 80%) der Immunglobuline und wurden aus diesem Grund auch zur Dialyse vereint. Eine zusätzliche Bande an der Position der schweren Ketten könnte auf unspezifisch an die Antikörper gebundene Proteine zurückzuführen sein. Während der Dialyse gab es einen geringen Verlust an Immunglobulinen (optische Abschätzung des Coomassie-Gels).

Nach der Aufreinigung wurde als nächstes die Reaktivität der Antikörper in einem gp120-ELISA (siehe 3.6.9) untersucht. Jeweils vier verschiedene Verdünnungen von Überstand, Durchfluss, Waschfraktion und Dialysat wurden auf das Bindungsvermögen der darin enthaltenen H902-Antikörper getestet. Wie aus den Ergebnissen der Abb. 4.25 deutlich wird, zeigten die erhaltenen Bindungsaktivitäten des Dialysats im Vergleich zum Überstand eine stärkere Bindung und bewiesen damit eine erfolgreiche Konzentration funktioneller Antikörper.

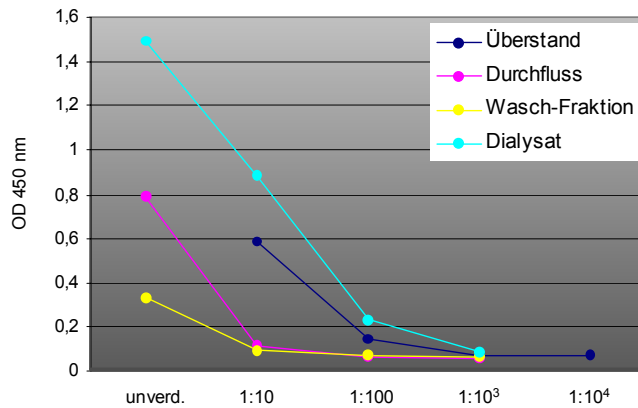


Abb. 4.25: Mengen funktioneller gp120-Antikörper in unterschiedlichen Fraktionen der Affinitätsaufreinigung über eine Protein-G-Säule.

Gezeigt sind die Messwerte eines gp120-Antikörper-ELISAs. Die angegebenen Fraktionen wurden dabei in unterschiedlichen Verdünnungen auf das Vorhandensein funktioneller gp120-Antikörper untersucht. Der Überstand entspricht der H902/NRS-Ausgangslösung.

Um die IgG-Konzentration des Dialysats zu erhöhen, wurde die IgG-Fraktion im Anschluss an die Dialyse noch ultrafiltriert (siehe 3.9.3). Vor dem Einsatz des aufgereinigten IgGs, wurde in weiteren Versuchen sichergestellt, dass die Neutralisationsaktivität auch nach der Ultrafiltration noch vorhanden war (Daten nicht gezeigt).

4.7.3 Analyse der aus Rattenseren affinitätsaufgereinigten Immunoglobuline

Nach der Affinitätsaufreinigung der Rattenseren mit Protein-G-Sepharose und einer Konzentration durch anschließende Ultrafiltration wurden die IgG-Fractionen auf ihre Neutralisationskapazität gegenüber homologen und heterologen Viren untersucht. Bei dem homologen Virus handelt es sich wieder um pNL4-3^{BH10} und bei den heterologen Viren um die T-tropen Primärisolate J27, J130, UG021, die M-tropen Primärisolat JRCSF und YU-2 sowie die M-tropen Laborisolate Ad8 und BaL. Außerdem wurde als Kontrolle einer möglichen unspezifischen Inhibition der Infektion die pNLΔEnv^{VSVG}-Infektiosität (siehe Abb. 4.23) nach Inkubation mit den IgG-Fractionen untersucht.

Die IgG-Fractionen aus Rattenseren, welche zuvor eine Neutralisation bzw. Inhibition von homologem und/oder heterologem Virus zeigten (*Env^{Fus}-Vakzin (1), *gp120/41 (1), *gp120/41 (2), *CD4/X4-PV und NRS) (siehe Abb. 4.21 und Abb. 4.22), die IgG-Fraktion des Serums von Tier *Env^{Fus}-PV, als Positivkontrolle H902-IgGs (aus 20 ml Hybridomüberstand) und, als Negativkontrolle, über die Protein-G-Säule „aufgereinigtes“ RPMI^k-Medium wurden auf ihr Vermögen zur Neutralisation der oben beschriebenen Virusisolate untersucht. Dazu wurden 1:20-Verdünnungen (im Bezug zur IgG-Menge im Serum) mit 50 (pNLΔEnv^{VSVG}, pNL4-3^{BH10}, J27, J130, UG021, BaL, JRCSF) bzw. 10 (Ad8) infektiösen Einheiten in einem Neutralisationsexperiment untersucht (siehe Abb. 4.26, A).

Als Kontrollen wurden außerdem drei verschiedene, in der Literatur als neutralisierend bzw. kreuzneutralisierend beschriebene Antikörper in einer Konzentration von je 10 µg/ml auf die Neutralisation der oben genannten Virusisolate analysiert. Dabei handelte es sich um H902-Hybridomüberstand und die zwei aufgereinigten Antikörper 2F5 und b12 (siehe Abb. 4.26, B).

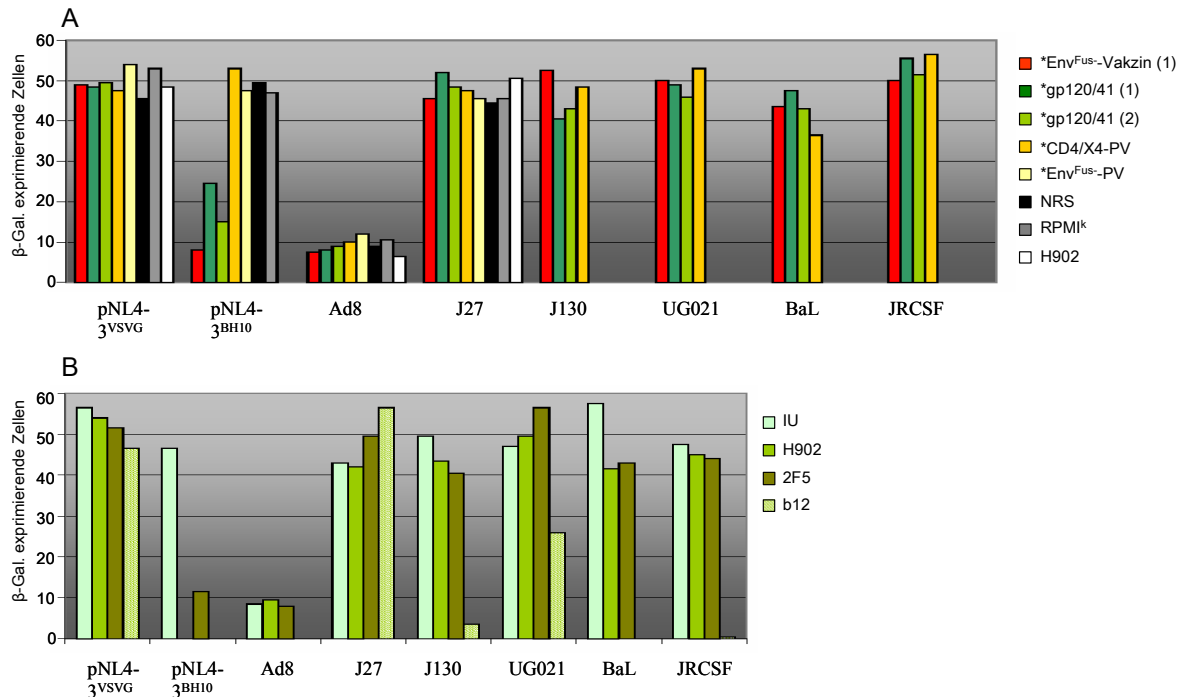


Abb. 4.26: Neutralisation von homologen und heterologen Viren durch Ratten-IgG- und H902-IgG-Fraktionen (A) und Kontrollantikörper (B).

(A) Gezeigt sind die Neutralisationseffizienzen von IgG-Fraktionen verschiedener Rattenserum in einer 1:20-Verdünnung (*Env^{Fus}-Vakzin (1), *gp120/41 (1), *gp120/41 (2), *CD4/X4-PV, *Env^{Fus}-PV und NRS) für die verschiedenen auf der x-Achse angegebenen Viren. Die Kontrollen RPMI^k-Medium und H902 wurden mit dem gleichen Protein G/Ultrafiltrationsprotokoll hergestellt wie die IgG-Fraktionen der Rattenserum. NRS, RPMI^k-Medium und H902 wurden nur mit den ersten vier der auf der x-Achse angegebenen Virusisolaten analysiert. NRS = Normales Rattenserum. (B) Gezeigt sind die Neutralisationseffizienzen von verschiedenen Kontrollantikörpern (H902, 2F5 und b12) in der Konzentration von je 10 µg/ml für die verschiedenen auf der x-Achse angegebenen Viren.

Die Anzahl der eingesetzten infektiösen Einheiten (IU) betrug für alle Viren 50 IU (außer Ad8 = 10 IU). Zur Auswertung wurden 24 Stunden nach der Infektion die β-Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Es sind Mittelwerte von Duplikaten eines Experiments gezeigt.

Aus den Ergebnissen der Abb. 4.26, A geht hervor, dass das pNLΔEnv^{VSVG}-Virus durch keine der gereinigten IgG-Fraktionen unspezifisch inhibiert wurde.

Die IgG-Fraktionen der Seren der Ratten, die mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert und *geboostet* wurden (*gp120/41 (1) und (2)), sowie des Serums der Ratte, die mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert und mit Env^{Fus}-Vakzin *geboostet* wurde (*Env^{Fus}-Vakzin (1)), zeigten eine Neutralisation des homologen Virus pNL4-3^{BH10}. Die IgG-Fraktionen von *Env^{Fus}-Vakzin (1) sowie von *gp120/41 (1) und (2), zeigten keine Neutralisation der heterologen Viren. Für die IgG-Fraktionen aller weiteren Seren (einschließlich der Negativkontrolle NRS) und das „aufgereinigte“ RPMI^k-Medium konnte keine Neutralisation von homologen oder heterologen Viren nachgewiesen werden.

Den in Abb. 4.26, B grafisch dargestellten Ergebnissen ist zu entnehmen, dass b12 alle Isolate außer J27 und die Negativkontrolle pNLΔEnv^{VSVG} neutralisierte (UG021 nur geringfügig). Deutlich weniger Neutralisationsaktivität zeigte 2F5, der in diesen Konzentrationen nur in der Lage war pNL4-3^{BH10} zu neutralisieren. H902 konnte ausschließlich die Infektion mit pNL4-3^{BH10} inhibieren.

In der 1:20 Verdünnung ist zu erkennen, dass die IgG-Fraktion des Serums der Ratte, die mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert und mit Env^{Fus}-Vakzin *geboostet* wurde (*Env^{Fus}-Vakzin (1)), eine stärkere Neutralisation des homologen Virus pNL4-3^{BH10} als die IgG-Fraktionen der Seren von mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisierten + *geboosteten* Tieren (*gp120/41 (1) und (2)) aufwies. Es wurden daher verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:20, 1:50, in Bezug auf die IgG-Menge im Serum) der IgG-Fraktionen dieser Seren und der Negativkontrolle RPMI^k-Medium mit 70 IU pNL4-3^{BH10} in einem Neutralisationsexperiment analysiert (siehe Abb. 4.27).

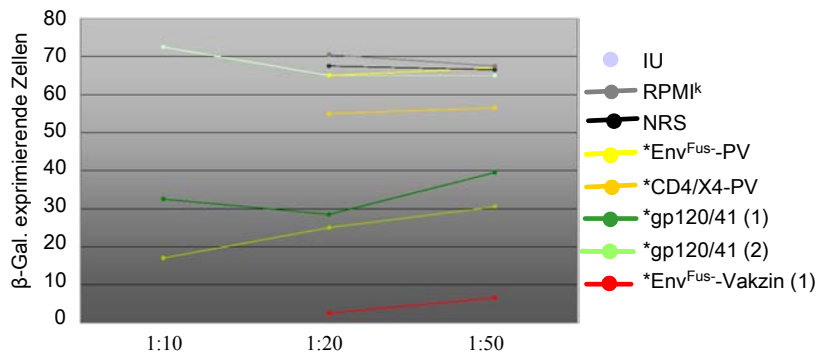


Abb. 4.27: Neutralisation des Virus pNL4-3^{BH10} durch IgG-Fraktionen verschiedener Verdünnungen.

Gezeigt sind die Neutralisationseffizienzen der IgG-Fraktionen von NRS, *Env^{Fus}-PV, *CD4/X4-PV, *gp120/41 (1), *gp120/41 (2), *Env^{Fus}-Vakzin (1) und der Negativkontrolle RPMI^k-Medium. Die IgG-Fraktionen wurden in 1:10, 1:20 und 1:50 Verdünnungen mit 70 infektiösen Einheiten (IU) pNL4-3^{BH10} getestet. Zur Auswertung wurden 24 Stunden nach der Infektion die β-Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten eines Experiments gezeigt.

Die Neutralisationseffizienz der IgG-Fraktion von Tier *Env^{Fus}-Vakzin (1) war deutlich besser als die der IgG-Fraktionen der Tiere *gp120/41 (1) und (2). Diese Tatsache ist interessant, da die *gp120/41-Tiere mit 10 µg und die *Env^{Fus}-Vakzin-Tiere mit nur 100-200 ng gp120 (eingebaut in Pseudovirionen) *geboostet* wurden. Dass zudem die IgG-Fraktion von Tier *Env^{Fus}-PV keine Neutralisation zeigte (obwohl dieses Tier dieselbe Menge an Env in Pseudovirionen, allerdings in anderen Konformationen, als es die *Env^{Fus}-Vakzin-Tiere bei den *boosts* injiziert bekamen), lässt vermuten, dass für die Induktion des beobachteten Neutralisationsvermögens möglicherweise konformationelle Epitope des Env^{Fus}-Vakzins verantwortlich sind, die eventuell die geringen Mengen an Env -Protein ausgleichen können.

4.7.4 Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper spezifisch für das HIV-1-Env-Protein

Hybridomzellen wurden aus den Milzen der Ratten *Env^{Fus}-Vakzin (1) und (2) (siehe Tab. 4.2), die mit gp120- und gp41-Protein vorimmunisiert und mit Env^{Fus}-Vakzin *geboostet* wurden, hergestellt. Aus ca. 6000 generierten Hybridomzellklonen pro Rattenmilz wurden aus *Env^{Fus}-Vakzin (1) 24 und aus *Env^{Fus}-Vakzin (2) 31 gp120/41-spezifische Klone subkloniert, deren unverdünnte Überstände im gp120- bzw. gp41-Antikörper-ELISA ODs 450nm zwischen 0,6-2,0 zeigten. Außerdem wurden pro Milz ca. 100 Klone auf ihre Produktion von CA-Antikörpern untersucht. Drei Klone (*Env^{Fus}-Vakzin (1)) bzw. ein Klon (*Env^{Fus}-Vakzin (2)) mit ODs 450 nm zwischen 0,8-1,1 im CA-Antikörper-ELISA wurden ebenfalls subkloniert.

17 von 55 Zellkulturüberständen blieben nach der ersten Subklonierung mit ODs 450 nm zwischen 0,15-1,5 positiv im ELISA für gp120/41-Antikörper. Vor der zweiten Subklonierung der 17 Hybridomklone wurde der Zellkulturüberstand aus den 96wells der 17 halbkonfluenten Hybridomklone auch in einem Neutralisationstest mit pNL4-3^{BH10} analysiert. In zwei unabhängigen Analysen war nur ein einziger Hybridomzellkulturüberstand (R I.23 B/3) aus der Milz von Ratte *Env^{Fus}-Vakzin (1) in der Lage, homologes Virus signifikant zu neutralisieren (Daten nicht gezeigt). Die gp120/gp41-Antikörpertiter der übrigen 16 Überstände wurden auch deshalb verworfen, weil sie beim zweiten *Screening* niedrig waren. Alle weiterführenden Untersuchungen betrafen somit nur den neutralisierenden Hybridomzellkulturüberstand des Klons R I.23 B/3.

In einem anschließenden ELISA gegen gebundenes gp120- oder gp41-Protein wurde festgestellt, dass der Klon R I.23 B/3 gp120-spezifische Antikörper produziert. Die gp120-Bindungskapazität des Zellkulturüberstands konfluenter R I.23 B/3-Zellen im Vergleich zum H902-Hybridomüberstand ist in Abb. 4.28 dargestellt. Beide Hybridomüberstände wiesen ähnliche Bindungstiter auf (etwa 50% Bindung in der Verdünnung 1:1000). Die Ursache für die unterschiedlichen Maximalwerte liegt vermutlich in der Verwendung von Zweitantikörpern aus unterschiedlichen Spezies begründet.

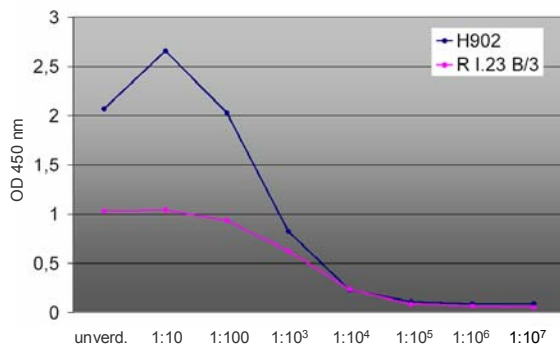


Abb. 4.28: gp120-Reaktivität von R I.23 B/3- und H902-Zellkulturüberstand.

Gezeigt sind die Messwerte eines gp120-Antikörper-ELISAs in den auf der x-Achse angegebenen Verdünnungen der Zellkulturüberstände.

Nachdem in einem Vorversuch festgestellt wurde, dass der R I.23 B/3-Zellkulturüberstand aus 96well-Zellkulturplatten halbkonfluenten Zellen das homologe Virus pNL4-3^{BH10} neutralisieren konnte (siehe oben), sollte nun der R I.23 B/3-Zellkulturüberstand von konfluenten Zellen in der Neutralisation getestet werden. Dazu wurde nicht nur homologes Virus (70 IU), sondern auch die heterologen Viren J27 (25 IU), J130 (35 IU), UG021 (30 IU), BaL (25 IU), JRCSF (15 IU) und YU-2 (8 IU) mit verschiedenen Konzentrationen des R I.23 B/3-Antikörpers gemischt. Zur Kontrolle wurden außerdem die monoklonalen Antikörper H902, 2F5, b12 und EGFR untersucht (siehe Abb. 4.29).

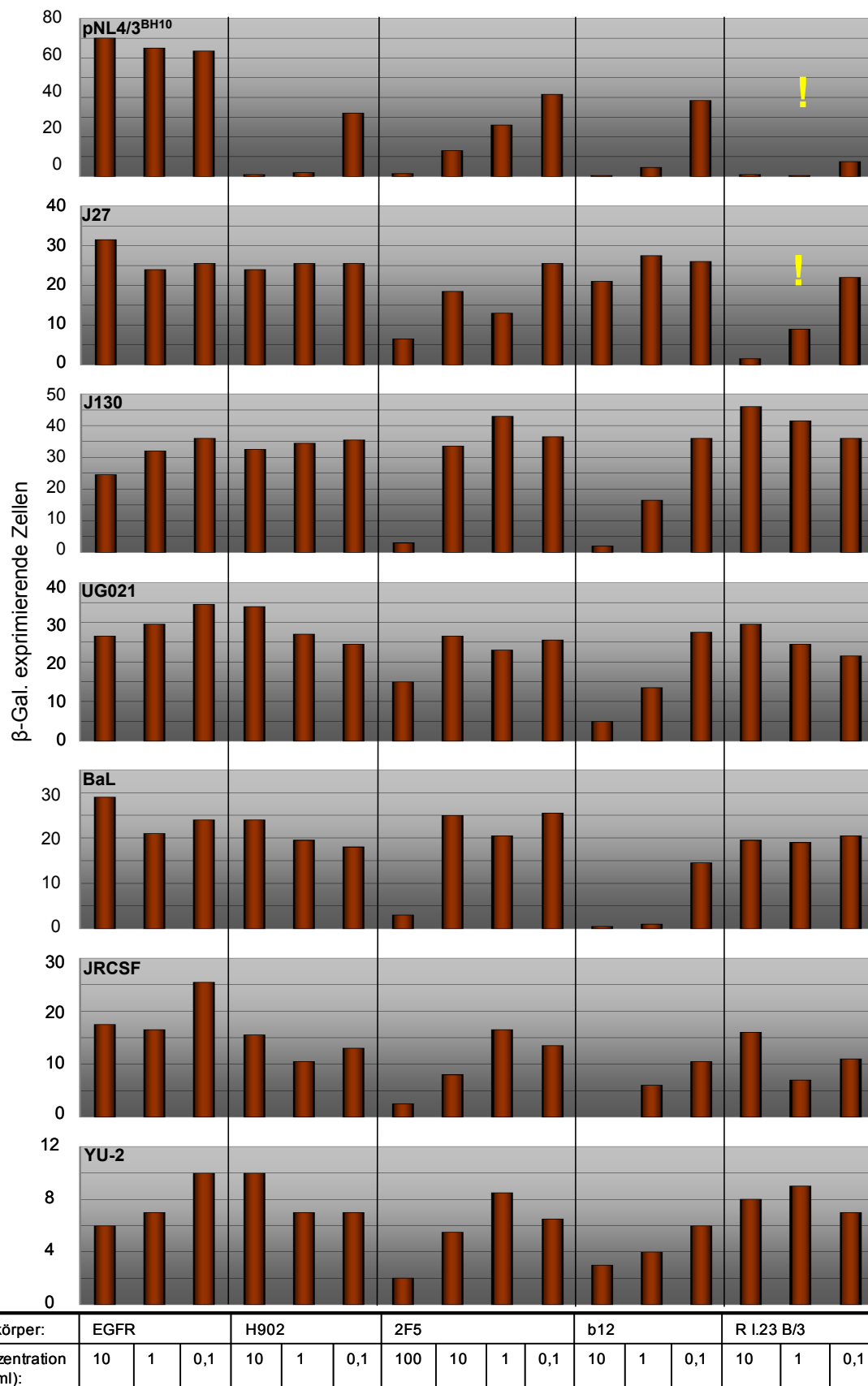


Abb. 4.29: Neutralisation verschiedener HIV-1-Isolate durch den Überstand des generierten Rattenhybridoms R I.23 B/3 und Kontrollantikörper (EGFR, H902, 2F5 und b12).

Gezeigt sind die Neutralisationseffizienzen von Hybridomüberständen (EGFR, H902, R I.23 B/3) und zwei aufgereinigten, humanen, monoklonalen, kreuzneutralisierenden Antikörpern (2F5 und b12) in verschiedenen Verdünnungen gegenüber den in der Abb. angegebenen HIV-1-Isolaten (eingesetzte IU siehe Text). Zur Auswertung wurden 24 Stunden nach der Infektion die β-Galaktosidase exprimierenden Zellen gezählt. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten eines Experiments gezeigt.

Wie den Ergebnissen von Abb. 4.29 zu entnehmen ist, neutralisierte R I.23 B/3 sogar noch bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml (bei einer geschätzten Antikörperkonzentration von 10 µg/ml in unverdünnten Hybridomüberständen) effizient das homologe Virus pNL4-3^{BH10}. Bemerkenswert ist, dass die Effizienz der Neutralisation von R I.23 B/3 größer war als die von H902. Außerdem neutralisierte R I.23 B/3 auch das Isolat J27, jedoch nicht die Isolate Ba-L, J130, UG021, YU2 und AD8 (AD8-Daten nicht gezeigt). Die Antikörper, die J27 zu neutralisieren vermögen, waren in der IgG-Fraktion des Serums der Ratte *Env^{Fus}-Vakzin (1) vermutlich unterrepräsentiert, was das dortige Fehlen einer Neutralisation von J27 erklärt.

Der humane Antikörper 2F5 neutralisiert, abgesehen von pNL4-3^{BH10}, nur bei sehr hohen Konzentrationen, wogegen b12 pNL4-3^{BH10}, BaL, JRCFSF, UG021 und J130 effizient, jedoch YU-2 sehr schlecht und J27 überhaupt nicht neutralisierte.

Die Isolierung des monoklonalen Antikörpers R I.23 B/3 aus der Ratte *Env^{Fus}-Vakzin (1) zeigt, dass es im Prinzip mit der zu analysierenden Vakzinierungsstrategie möglich ist, Antikörper zu induzieren, die auch heterologe HIV-1-Primärisolate, hier J27, neutralisieren können.

5 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer neuen, auf HIV-Env basierenden Vakzinierungsstrategie. Dazu wurden sich im HIV-Env-vermittelten Fusionsprozess befindliche Pseudovirionen fixiert und als Immunogen verwendet. Es wurden zuvor Versuche zur Herstellung und Charakterisierung der Pseudovirionen unternommen, die der Verbesserung der PV-Qualität und -Produktion dienten. Das daraus resultierende PV-Vakzin wurde in nicht transgenen Mäusen und in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten auf die Induktion neutralisierender oder kreuzneutralisierender Antikörper untersucht.

5.1 Herstellung der PV-Präparationen

Die zwei verschiedenen PV-Präparationen (Env-PV, CD4/X4-PV), die in dieser Arbeit zur Herstellung des PV-Vakzins zum Einsatz kamen, wurden durch eine Kotransfektion der entsprechenden Expressionsplasmide in 293T-Zellen hergestellt.

Zunächst erfolgte die Herstellung der Pseudovirionen in mehreren Zellkulturschalen mit einer anschließenden Ultrazentrifugation des Zellkulturüberstands. Es zeigte sich jedoch, dass der Arbeits- und Zeitaufwand dieser Prozedur sehr groß war und die für die anstehenden Immunisierungsexperimente erforderlichen Mengen an Pseudovirionen auf diese Weise nicht herzustellen waren. Außerdem war die Reinheit der Pseudovirionen nicht ausreichend.

Es wurden daher Verfahren etabliert, mit denen Pseudovirionen viel einfacher und in größeren Mengen in so genannten *Zell-Factories* mit anschließender Ultrazentrifugation zuvor ultrafiltrierter Viruskonzentrate gewonnen werden konnten. Auf diese Weise war es möglich, in Kombination mit der Plasmid-Giga-Präparation, innerhalb kürzerer Zeit Env^{WT}-, Env^{Fus}- oder CD4/X4-PV im mg-Bereich (CA) herzustellen. Die ermittelten Verluste während der PV-Aufreinigungen waren akzeptabel und die hergestellten Pseudovirionen nahezu frei von nicht viralen Proteinen.

Vor der Herstellung des eigentlichen Vakzins wurden die ultrazentrifugierten Env- und CD4/X4-PV bei -70°C gelagert. Untersuchungen der Effekte der Ultrazentrifugation und Lagerung bei -70°C auf die Funktionalität der Pseudovirionen bzw. der eingebauten Glykoproteine ergaben eine nur ca. 50%ige Reduktion der Infektiosität und eine mit nicht konzentrierten Viren vergleichbare interretrovirale Fusionseffizienz.

Bereits veröffentlichte Arbeiten zeigen ebenfalls, dass Virussuspensionen nach einer Ultrazentrifugation und -70°C-Behandlung weiterhin, wenn auch mit Verlusten von 60-80%, infektiös bleiben (Hammonds *et al.*, 2003; Tjotta *et al.*, 1991).

Durch die im Vergleich zu nicht ultrazentrifugierten Pseudovirionen erhöhte räumliche Nähe in einem Gemisch von zentrifugierten Env- und CD4/X4-PV hätte es unter Umständen zu

einer effizienteren interviralen Fusion bzw. Transduktion des Luziferasegens kommen können. Dies war jedoch nicht der Fall und ist eventuell auf die Verluste an Infektiosität während der Ultrazentrifugation zurückzuführen.

Für die Herstellung des PV-Vakzins für die anschließenden Immunisierungsexperimente wurden schließlich ultrazentrifugierte und bei -70°C gelagerte Pseudovirionen verwendet, da die ermittelten Verluste der Infektiosität annehmbar waren.

5.2 Einbau von Env-Glykoproteinen in Pseudovirionen

Die Menge an in Pseudovirionen eingebauten Env-Molekülen ist für die Stärke der Induktion einer Env-spezifischen humoralen Immunantwort wichtig. Analysen der Proteinzusammensetzung von Env-PV (Env^{WT}- und Env^{Fus}-PV) in Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen zeigten keine gefärbten Banden an der Position von gp120 bzw. gp41. In Silbergelen (Daten nicht gezeigt) waren zwar zahlreiche Banden höherer molekularer Größe detektierbar, aber durch Überlagerungen von Signalen war der spezifische Nachweis von gp120 in diesen Gelen unmöglich.

Dagegen wurde durch semiquantitative Western-Blot-Analysen von Env-PV der Einbau von 10-40 ng gp120-Protein pro 1 µg Kapsidprotein (CA) nachgewiesen. Dies entspricht einem molaren gp120/CA-Verhältnis von 1:500-1:125, was wiederum 2-8 gp120-Monomeren pro 1000 CA-Proteine entspricht. Basierend auf der Annahme (siehe unten), dass ein Pseudovirion etwa 2500 Kapsidproteine enthält, wurden demzufolge 5-20 gp120-Monomere (1-6 Env-Trimere) in ein Pseudovirion eingebaut.

Frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Env-Einbau in unreifen, im *budding*-Prozess befindlichen HI-Viren ergaben eine Anzahl von ca. 70 inkorporierten Env-Trimern pro Virion (Gelderblom *et al.*, 1987). In biochemischen Analysen zellfreier Viren wurde ein molares gp120/CA-Verhältnis von ca. 1:60 ermittelt (Chertova *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2003). Das entspricht 7-14 Env-Trimern pro Virion für angenommene 1.200 bis 2.500 Kapsidproteine. Diese Anzahl der Kapsidproteine wurde entweder durch die Bestimmung des Verhältnisses viraler RNA zu CA (ca. 2500 CA-Proteine) (Piatak *et al.*, 1993) oder durch einen Vergleich der Konzentrationen von Kapsid- und Env-Molekülen aufgereinigter Virionenpräparationen mit der elektronenmikroskopisch ermittelten Anzahl von Env-Trimern in diesen Präparationen bestimmt (ca. 1400 CA-Proteine) (Zhu *et al.*, 2003). Weitere Analysen vergleichen die CA-Konzentration in einer PV-Präparation mit der Anzahl von Virionen, die durch eine elektronenmikroskopische Analyse bestimmt wurde (ca. 1200 CA-Moleküle) (Layne *et al.*, 1992). Neue elektronenmikroskopische Untersuchungen führten allerdings zu der Annahme, dass etwa 5000 CA-Proteine an der Bildung eines Virions beteiligt sind (Briggs *et al.*, 2004). Ausgehend von diesem Wert wäre die tatsächlich

inkorporierte Anzahl von Env-Molekülen, die nach dem oben genannten biochemischen Verfahren ermittelt wurde, um den Faktor zwei bis drei höher.

Das in dieser Arbeit ermittelte gp120/CA-Verhältnis von 1:500-1:125, liegt unterhalb der oben beschriebenen Werte. Bei den in dieser Arbeit analysierten Virionen handelt es sich jedoch nicht um aus Infektionen freigesetzte Viren, sondern um Pseudovirionen, die in Kotransfektionen von 293T-Zellen hergestellt wurden. Das bedeutet, dass zur Generierung von Pseudovirionen mit eingebautem Env-Protein jeweils der Transfer von zwei Plasmiden in die 293T-Zellen erfolgen musste. Es konnte jedoch nicht endgültig nachgewiesen werden, dass dies tatsächlich in der Mehrzahl der Zellen der Fall war.

Auch andere Publikationen berichten von zum Teil geringeren Env-Einbauwerten in Virionen. Ein um den Faktor 10 niedrigerer Env-Einbau wurde beispielsweise in Virionen gezeigt, die in 293T-Zellen statt in PBMCs produziert wurden (Louder *et al.*, 2005). Stark variierende Einbauergebnisse wurden auch von weiteren Autoren erhalten, die in verschiedenen Virusisolaten ein molares Verhältnis von gp120 zu CA von 1:45 - 1:908 ermittelten (Hammonds *et al.*, 2003).

5.3 Versuche zur Erhöhung der Einbauwerte von Env-Glykoproteinen in Pseudovirionen

Die oben diskutierten Punkte verdeutlichen, dass eine mögliche Schwäche hinsichtlich der Immunogenität der PV-Präparation in ihrem geringen Env-Einbau liegt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt, um die Menge an exprimiertem Env zu erhöhen. Dabei handelt es sich einerseits um den Austausch des homologen Signalpeptids (SP) von HIV-1-Env gegen zwei heterologe SP und andererseits um die Verwendung eines kodonoptimierten HIV-1-Env-Expressionskonstrukts. Es wurde untersucht, ob durch eine möglicherweise verstärkte Expression von Env-Proteinen die Menge an eingebautem Env in Pseudovirionen erhöht werden kann. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Virionen, welche sich von Plasmamembranen mit erhöhten Env-Konzentrationen abschnüren, auch größere Mengen an Env passiv einbauen können.

5.3.1 Austausch des HIV-1-Env-Signalpeptids

Li *et al.* haben gezeigt, dass eine Deletion des HIV-1-Env-Signalpeptids zur Expression erhöhter Mengen an nicht sekretiertem gp120-Protein in Insektenzellen (SF9) führte. Der Austausch des homologen Env-SP gegen das einfach positiv geladene SP des Mellitin von *Apis mellifera* (Honigbiene) oder das ungeladene SP des murinen IL-3 führten dagegen zu erhöhten Mengen an sekretiertem gp120-Protein. Diese erhöhte Sekretion von gp120 in

Insektenzellen zeigten auch Env-Glykoproteine, aus deren SP einzelne oder mehrere, jedoch nicht alle, positiv geladenen Aminosäuren entfernt wurden (Li *et al.*, 1994). Herrera *et al.* konnten bei einem Austausch des homologen HIV-1-Env-Signalpeptids gegen das sechsfach positiv geladene Signalpeptid von t-PA (*tissue plasminogen activator*) oder das einfach negativ geladene Signalpeptid von Erythropoetin (Epo) eine leicht verstärkte gp120-Sekretion in eukaryotischen Zellen feststellen (Herrera *et al.*, 2000). Obwohl es in dieser Veröffentlichung nur zu einer schwachen Erhöhung der gp120-Sekretion kam, ist auffallend, dass in zahlreichen Arbeiten zur Env-Expression Expressionsplasmide mit diesen heterologen SP verwendet wurden (z.B. Binley *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte keine verstärkte Env-Expression von Expressionsplasmiden mit heterologen Signalpeptiden (t-PA, Epo) festgestellt werden, was vergleichbar ist mit der nur geringen Steigerung der gp120-Expression, die von Herrera *et al.* nachgewiesen wurde. Auch die Menge an Env, welche in Pseudovirionen eingebaut wurde, war durch die Verwendung der heterologen SP im Vergleich zu Env mit homologem SP unverändert.

5.3.2 Kodonoptimiertes Env-Expressionskonstrukt

In *gag*, *pol* und *env* liegen inhibitorische Sequenzen (INS), die den Export ungespleißter Gag/Pol-mRNAs sowie einfach gespleißter Env-mRNAs vom Kern ins Zytoplasma inhibieren. Durch die Bindung des HIV-1-Rev-Proteins an das RRE (*rev response element*) in *env* wird jedoch diese Inhibition des Exports aufgehoben, und die Expression des Env-Proteins erfolgt. Bei einem kodonoptimierten *env* ist die Nukleotidsequenz der viralen Kodons zu Kodons von stark exprimierten humanen Genen verändert, was zu einer Rev-unabhängigen Expression führt. In dieser Arbeit wurde das kodonoptimierte 89.6P-Env verwendet. Bei seiner transienten Expression in 293T-Zellen wurde eine um den Faktor drei bis fünf stärkere Expression als von dem sonst in dieser Arbeit verwendeten Rev-abhängigen BH10-Env beobachtet. Publierte Daten weisen allerdings deutlichere Steigerungen in der Expression kodonoptimierter Env-Proteine auf (Chakrabarti *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003). Der Grund dafür liegt womöglich darin, dass die jeweiligen Autoren Rev-unabhängige, kodonoptimierte Expressionskonstrukte mit Rev-abhängigen HIV-Wt-Konstrukten verglichen, denen Rev *in trans* fehlte. Das in dieser Arbeit verwendete BH10-Env-Konstrukt kodiert dagegen außer für Env auch für Rev (sowie für Tat und Vpu).

Aufgrund des auch in anderen Publikationen beschriebenen zytotoxischen Effekts des kodonoptimierten Envs in transfizierten Zellen (Chakrabarti *et al.*, 2002) und die vermutlich damit zusammenhängende verringerte Produktion von Pseudovirionen konnte das kodonoptimierte Env-Expressionskonstrukt jedoch in weiteren Versuchen keine praktische Anwendung finden.

5.4 Eigenschaften des Vakzins

5.4.1 Eigenschaften der induzierten Env-Konformationen

Wie schon ausführlich erläutert, basiert die Vakzinierungsstrategie dieser Arbeit auf der Präsentation von Env-Epitopen, die während der Fusion von Env-PV mit CD4/X4-PV induziert werden. Um solche Env-Epitope anzureichern, wurde versucht, diesen Fusionsvorgang während einer Zwischenphase zu stoppen. Es wurden zwei Strategien zum Fixieren dieser Env-Epitope in Erwägung gezogen: Die chemische Fixierung mit Glutaraldehyd und die so genannte genetische Fixierung durch die Verwendung eines mutierten Env-Proteins. In der Anfangsphase der Arbeit wurden beide Strategien verfolgt, während in späteren Immunisierungsexperimenten nur noch genetisch fixiertes Env^{Fus}-Vakzin verwendet wurde.

Die für die Env^{WT}-Vakzin-Produktion gewählten Zeiten von 5, 20 und 60 Minuten bis zum chemischen Abstoppen der Fusion zwischen Pseudovirionen basieren zum einen auf der in dieser Arbeit analysierten interretroviralen Fusionskinetik und zum anderen auf bereits publizierten Daten, die 30 Minuten für eine vollendete Fusion beschreiben (zur Übersicht: Blumenthal *et al.*, 2002; Finnegan *et al.*, 2001; Weiss *et al.*, 1996). Erste konformationelle Änderungen sind laut Frey *et al.* aber bereits nach zehn Minuten nachweisbar, was vermutlich auf die Bindung von gp120 an CD4 zurückzuführen ist. (Frey *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde eine Zeit von 40 Minuten zum Ablauf der interviralen Fusion ermittelt. Dies deckt sich somit mit den Ergebnissen zur Fusionskinetik der oben angegebenen Autoren.

Es ist jedoch anzunehmen, dass die intermediären Env-Epitope, die im Env^{WT}-Vakzin fixiert wurden, stark heterogen waren. Das heißt, dass individuelle Konformationen wahrscheinlich nicht in ausreichender Menge exponiert wurden. Ferner veränderte möglicherweise die chemische Fixierung und Quervernetzung durch Glutaraldehyd die fusionsspezifischen konformationellen Epitope. Aus diesen Gründen wurde diese Strategie nicht weiter verfolgt.

Das im Env^{Fus}-Vakzin verwendete Env-Glykoprotein weist an der AS-Position 2 des gp41-Fusionspeptids einen V (Valin) → E (Glutaminsäure)-Austausch auf (Freed *et al.*, 1990). Somit wurde eine hydrophobe Aminosäure gegen eine saure Aminosäure ausgetauscht. Die Mutation im Env-Protein bewirkt das Ausbleiben einer Synzytienbildung mit CD4/Korezeptor-exprimierenden Zellen unter weiterhin funktioneller Bindung an CD4. Das bedeutet, dass durch diese Mutation die Kaskade der induzierten konformationellen Änderungen unterbrochen wird und konformationelle Epitope inmitten des natürlichen Fusionsprozesses genetisch fixiert und dadurch angereichert werden. Man geht davon aus, dass es zu sämtlichen Konformationsänderungen kommt, bis das Ausbleiben der Insertion oder eine

fehlerhafte Insertion des Fusionspeptids in die virale Membran des CD4/X4-PV diesen Prozess beendet. Im Gegensatz zum mit Glutaraldehyd fixierten Env^{WT}-Vakzin werden dabei neue konformationelle Epitope (siehe unten) in einer eventuell recht homogenen Form und in ausreichender Menge präsentiert. Da man die induzierten Epitope und die dadurch hervorgerufenen Immunantworten durch die Wahl des mutierten Env-Glykoproteins natürlich nur sehr schwer vorhersehen kann, werden in weiteren Studien in unserer Arbeitsgruppe Env-Proteine mit anderen Mutationen verwendet werden. Diese liegen im alpha-helikalen Bereich von gp41 (Weng und Weiss, 1998) oder stellen Proteine mit kovalent verknüpften gp41- und gp120- Untereinheiten dar (Binley *et al.*, 2000).

5.4.2 Anzahl der Env-Moleküle mit induzierten Epitopen

Für die hier untersuchte Vakzinierungsstrategie war es wünschenswert, dass möglichst jedes Env-Trimer in den fusionierten retroviralen Strukturen als Fusionsintermediat vorliegt. Das nachgewiesene molare Verhältnis von CD4 zu CA von 1:115 bis 1:30 bedeutet, dass bis zu 16-mal mehr CD4-Proteine als gp120-Monomere pro Pseudovirion enthalten waren. Es ist allerdings nicht bekannt, ob tatsächlich jedes Env-Molekül im PV-Vakzin auch mit einem CD4-Molekül assoziiert war.

In einem indirekten Assay, nämlich der Transduktion von Luziferaseaktivität, wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass 2-4% der im Vakzin befindlichen Pseudovirionen eine interretrovirale Fusion eingegangen sind, was zwar im signifikanten Bereich liegt, jedoch immer noch recht ineffizient ist. Es ist aber denkbar, dass eine geringere Infektiosität der fusionierten Strukturen eine geringere Luziferasegentransduktion im Vergleich zu der Luziferasegentransduktion von Env^{WT}-PV direkt bedingt. Die tatsächliche Anzahl fusionierter Strukturen wäre dann höher.

Eine mit diesen PV-Präparationen bisher noch nicht untersuchte Frage ist, ob es durch die Interaktion von Env- mit CD4/X4-PV zu einem *shedding* von gp120 kommt (Ablösen von gp120 von gp41). Sowohl im Zusammenhang von Env-exprimierenden Zellen als auch von Virionen in Zellkulturüberständen wird von CD4-induziertem *shedding* berichtet (Bugelski *et al.*, 1991; Fu *et al.*, 1993; Groenink *et al.*, 1995; Hart *et al.*, 1991; Moore und Klasse, 1992; Willey *et al.*, 1994). Auch bei der Verwendung von durch Ultrazentrifugation aufgereinigten Virionen konnte dies zum Teil gezeigt werden (Hammonds *et al.*, 2003), während bei anderen Versuchen *shedding* nicht beobachtet wurde (Chertova *et al.*, 2002). Dabei gehen Chertova *et al.* davon aus, dass schwach mit viralen Partikeln assoziierte gp120-Moleküle möglicherweise durch die Ultrazentrifugation entfernt werden und somit nur stabile gp41-gp120-Komplexe in diesen Virionenpräparationen enthalten sind. Daher ändert sich das

molare Verhältnis von gp120 zu gp41 dann auch nicht durch die Zugabe von sCD4 (*soluble* CD4).

Zur Herstellung des in dieser Arbeit verwendeten Vakzins wurden ultrazentrifugierte Pseudovirionen verwendet. Somit kam es in dem PV-Vakzin möglicherweise nicht zum *shedding* von gp120. Falls dies allerdings doch der Fall gewesen sein sollte, wäre gp120 trotzdem weiterhin in der PV-Vakzinpräparation enthalten. Jedoch wäre es nicht mehr über gp41 mit der viralen Membran assoziiert, sondern läge vermutlich in einer anderen fusionsinduzierten Konformation frei im Lösungsmittel (PBS) vor.

5.4.3 Nachweis von induzierten Env-Epitopen

In unserer Arbeitsgruppe wurde auch versucht nachzuweisen, dass Env-Epitope, die in unbehandelten Env^{Fus}-PV für Antikörper unzugänglich waren, im Env^{Fus}-Vakzin tatsächlich induziert worden sind. Es wurden einige Env-spezifische Mabs beschrieben, deren Bindung eine vorherige Interaktion von Env mit CD4 voraussetzt. Sie sind somit gegen CD4-induzierte Epitope gerichtet. Mit Hilfe eines bereits beschriebenen Nachweisverfahrens (Cleveland *et al.*, 2003), dem sogenannten Epitop-ELISA, ist gezeigt worden, dass durch die Zugabe von CD4/X4-PV oder sCD4 zu Env^{Fus}-PV CD4-induzierte Env-Epitope exponiert werden, die in unbehandelten Env^{Fus}-PV nicht vorhanden sind (unveröffentlichte Daten). Es wird auch angenommen, dass im Anschluss an die CD4-Bindung weitere konformationelle Änderungen durch die Interaktion mit CD4/X4-PV induziert werden. Es wurden jedoch nur wenig Antikörper beschrieben, die gegen diese fusionspezifischen Epitope gerichtet sind. Einer davon ist 8F101, der spezifisch für ein Epitop ist, welches in einem Env/CD4/Korezeptor-Trikomplex induziert wird (Finnegan *et al.*, 2001).

5.5 Vorstudien zur Env-spezifischen humoralen Immunantwort in Mäusen

Die Ergebnisse zahlreicher Immunisierungsexperimente in nicht transgenen Mäusen haben gezeigt, dass die Applikation von Env^{WT}- und Env^{Fus}-PV oder -Vakzin *allein*, d.h. ohne eine Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein, in den Seren der Tiere nur sehr geringe Antikörpertiter gegen gp120 und gp41 induziert. Darüber hinaus kam es zur Induktion von zumindest teilweise unspezifischen und kreuzreaktiven Antikörpern bei Immunisierungen mit unreinen, in Zellkulturschalen hergestellten PV-Präparationen. Diese Antikörper sind vermutlich gegen nicht virale Proteine der Präparationen, wahrscheinlich Kohlenhydratanteile, gerichtet. Unspezifische, mit HIV-gp120 kreuzreaktive Antikörper wurden auch bei Immunisierungen von Tieren mit anderen Retroviren induziert und beschrieben (Louie *et al.*, 2003; Montelaro *et al.*, 1988; Tesoro-Cruz *et al.*, 2003).

Bisher veröffentlichte Arbeiten von Immunisierungsexperimenten mit VLPs, Pseudovirionen oder inaktivierten HI- oder SI-Viren in Nagetieren oder Makaken beschreiben sowohl recht hohe (Haffar *et al.*, 1991b; Haynes *et al.*, 1991; Rovinski *et al.*, 1992), als auch teilweise recht niedrige (EU, 1995) Env-Antikörpertiter im ELISA. Weitere Autoren präsentieren ausschließlich Western-Blot-Analysen und beschreiben schwache, aber erkennbare gegen Env gerichtete Immunantworten in nur einem Teil der Tiere (Lifson *et al.*, 2002; Lifson *et al.*, 2004; Montefiori *et al.*, 2001).

Die niedrigen Antikörpertiter, die in dieser Arbeit in den jeweiligen murinen Seren nachgewiesen wurden, waren höchstwahrscheinlich durch die Unterrepräsentation von Env-Glykoproteinen und die Überrepräsentation von Kontaminationen in den in dieser Arbeit verwendeten PV-Präparationen bedingt. Die Anzahl spezifischer B-Zellen gegen das Env-Antigen war womöglich zu gering, und deshalb schlugen Versuche zur Produktion von Env-spezifischen monoklonalen Antikörpern fehl.

Für diese Arbeit bedeutete dies, dass zur erfolgreichen Generierung Env-spezifischer monoklonaler Antikörper und höherer Env-Antikörpertiter in Seren das Immunisierungsprotokoll optimiert werden musste. Darüber hinaus wurden für die Versuche mit transgenen Ratten nur noch reine PV-Präparationen für Immunisierungen verwendet.

5.6 Humorale Immunantwort in Mäusen nach Immunisierungen mit einem veränderten Protokoll

Mit dem Ziel, das Immunsystem auf die geringe Menge an konformationell relevanten Env-Proteinen in den PV-Präparationen zu lenken, wurde das Immunisierungsprotokoll geändert. Durch die Anwendung eines heterologen *prime-boost*-Protokolls, das eine Vorimmunisierung mit den gereinigten rekombinanten Proteinen gp120 und gp41 beinhaltete, sollte die Bildung Env-spezifischer T_H2-Zellen vor der eigentlichen Immunisierung mit dem PV-Vakzin induziert werden. Auch in anderen Arbeiten wird zur Induktion einer stärkeren Immunantwort bei Immunisierung mit HIV-VLPs eine Vorimmunisierung angewandt (Leung *et al.*, 2004). Mit diesem veränderten Immunisierungsprotokoll war es möglich, Env-spezifische monoklonale Antikörper (Mabs) zu generieren und höhere Env-Antikörpertiter in den murinen Seren zu induzieren. Die generierten Mabs waren zur Zeit der Analyse (zwei Monate nach der Proteinvorimmunisierung) sehr wahrscheinlich gegen Epitope des PV-Vakzins gerichtet und weniger gegen Epitope der Env-Proteine, welche für die Vorimmunisierung benutzt wurden. Die Analyse der Seren ergab einen hohen gp41-Titer, allerdings nur einen sehr niedrigen gp120-Titer. Das lässt vermuten, dass das hier verwendete rekombinante, in Insektenzellen produzierte gp120 nur sehr schwach immunogen ist. In Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gelen erschien das Protein an der erwarteten Position in der erwarteten Intensität. Der

Grund für die mögliche schwache Immunogenität ist somit nicht bekannt und könnte auf eine abweichende Glykosylierung zurückzuführen sein.

Eine Analyse der Seren auf ihre Neutralisationsaktivität war nicht möglich, da in den Seren eventuell vorhandene CD4- und CXCR-4-Antikörper mit dem Neutralisationstest interferieren könnten und eine Aufreinigung der IgG-Fractionen der Seren aufgrund des geringen Volumens an Serum pro Maus nicht durchführbar war.

In vier Zellfusionen wurden zehn gp120- und drei gp41-spezifische Klone etabliert. Viele andere Env-spezifische Hybridomzellklone stellten ihre Antikörperproduktion vermutlich aufgrund chromosomaler Instabilität oder aufgrund von Nachteilen in der Wachstumskinetik ein. Unerwartet war, dass trotz der geringen gp120-Titer der Seren die Zahl der gp120-spezifischen Klone höher war als die der gp41-spezifischen. Möglicherweise waren im PV-Vakzin-boost mehr gp120- als gp41-spezifische Epitope exponiert. Dafür könnte es zwei mögliche Ursachen geben: Zum einen kann gp41 im PV-Vakzin, zumindest teilweise, durch gp120 verdeckt sein. Zum anderen könnte durch *shedding* freigesetztes gp120 immunogener sein als mit Pseudovirionen assoziiertes gp41.

Nach Immunisierungen mit *Env^{Fus}-Vakzin wurden deutlich mehr Env-spezifische Zellklone mit stärkeren Signalen generiert als nach Immunisierungen mit Glutaraldehyd fixiertem *Env^{WT}-Vakzin (* steht für die Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120 und gp41). Durch die Fixierung und Quervernetzung der Proteine im Env^{WT}-Vakzin ist anzunehmen, dass andere Antikörper als in Präparationen von nicht fixierten Proteinen induziert werden. Diese Antikörper können möglicherweise nicht an monomeres Env-Protein, welches im ELISA verwendet wird, binden. Da auch Antikörper gegen fusionsspezifische konformationelle Epitope des Env-Vakzins möglicherweise nicht an monomeres Env-Protein binden können, werden in aktuellen Experimenten in unserer Arbeitsgruppe Hybridomzellkulturüberstände sowohl auf Env-Bindung als auch auf Virusneutralisation hin analysiert. Somit können neutralisierende Env-Antikörper unabhängig von ihrer Fähigkeit, im ELISA an monomeres Env zu binden, identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich ein neutralisierender Antikörper beschrieben, der nicht an monomerisches gp120-Protein binden kann (Gorny *et al.*, 2005).

Bei der anschließenden Untersuchung der 13 generierten Env-spezifischen monoklonalen Antikörper konnte kein Mab identifiziert werden, der zumindest das homologe Virus pNL4-3^{BH10} neutralisieren kann. Allerdings wiesen nur drei davon eine starke Env-Bindungskapazität im ELISA auf. Der Umstand, dass kein neutralisierender oder kreuzneutralisierender Antikörper unter den generierten monoklonalen Antikörpern zu finden war, bedeutet nicht zwangsläufig ein Fehlen interessanter Epitope im PV-Vakzin. Vielmehr kann es sein, dass die geringe Anzahl der generierten Env-spezifischen Hybridomklone die Detektierung der relevanten Zellklone unterband.

5.7 Humorale Immunantwort in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten

Immunisierungen in huCD4/huCXCR-4 transgenen Ratten ermöglichten aufgrund ihrer Toleranz gegen huCD4 und huCXCR-4, und dem damit einhergehenden Fehlen von huCD4- und huCXCR-4-Antikörpern, zum ersten Mal Analysen der Seren hinsichtlich ihrer Neutralisationskapazität. Die große Menge an gewonnenem Serum pro Versuchstier im Vergleich zu den Mengen von Mäusen ermöglichte zudem eine Aufreinigung der IgG-Fraktionen. Des Weiteren konnten die im Laufe dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, nämlich die Notwendigkeit einer Vorimmunisierung mit rekombinantem gp120/41-Protein und die Vermeidung kreuzreaktiver Antikörper durch Immunisierungen mit reineren PV-Präparationen, angewendet werden.

Wie schon zuvor bei Mäuseseren (Daten nicht gezeigt), ergaben Analysen der Rattenserum, dass es zu einer unspezifischen Inhibition von Virusinfektiosität kommen kann. Es ist möglich, dass es sich bei der inhibitorischen Komponente um das Komplementsystem handelt, welches durch Erhitzen auf 60°C zu beseitigen gewesen wäre; jedoch könnten auch hitzestabile, inhibitorische Komponenten unbekannter Natur vorhanden gewesen sein. Aus diesem Grund sollten die über Säulen aufgereinigten Antikörperfraktionen in Neutralisationsexperimenten eingesetzt werden.

Die Analyse der IgG-Fraktionen zeigte, dass beide Seren der Positivkontrolle und eines der zwei Seren von Ratten, welche *Vakzin-boosts* erhalten hatten (Ratte 5), ein Neutralisationsvermögen gegenüber homologem Virus aufwiesen. Die Vakzin-Ratte (Ratte 6), mit deren Serum-IgG-Fraktion keine Neutralisation erreicht werden konnte, zeigte auch nur einen niedrigen gp120-Bindungstiter im Serum, so dass das Ausbleiben einer Neutralisation eventuell zu erwarten gewesen war. Auch alle weiteren IgG-Fraktionen waren negativ in der Neutralisation, was einerseits bedeutet, dass durch die Vorimmunisierung mit gp120/41-Protein kein Neutralisationsvermögen induziert wurde. Andererseits machten Analysen mit VSV-Glykoprotein pseudotypisierten Viren deutlich, dass die neutralisierenden Antikörper nicht gegen zelluläre Proteine gerichtet waren. Durch Bindung solcher Antikörper an in die Virushülle eingebaute Proteine hätte es aufgrund sterischer Inhibition auch zu einer Unterbindung der Infektiosität kommen können.

Die Serum-IgG-Fraktion der Vakzin-Ratte (Ratte 5) besaß ein gegenüber den Positivkontrollen signifikant erhöhtes Neutralisationsvermögen hinsichtlich des homologen Virus, konnte jedoch keine heterologen Viren neutralisieren. Dieses erhöhte Neutralisationsvermögen ist bemerkenswert angesichts der Tatsache, dass die Tiere der Positivkontrolle bei den *boosts* eine mindestens 25fach höhere Menge an Env-Protein erhalten hatten als die Vakzin-Ratten. Außerdem zeigte das Tier, welches *boosts* mit Env^{Fus}-PV *allein* bekam (d.h. Pseudovirionen, welche nicht mit CD4/X4-PV gemischt wurden, wie

das beim Env^{Fus}-Vakzin der Fall ist), keine neutralisierende Immunantwort. Dies ist vermutlich auf neue konformationelle Epitope des Env^{Fus}-Vakzins zurückzuführen.

Obwohl die IgG-Fraktion der Vakzin-Ratte ausschließlich homologes Virus neutralisieren konnte, vermittelte der generierte monoklonale Antikörper R I.23 B/3 neben einer starken Neutralisation des homologen Virus auch die Neutralisation des Primärisolats J27. Generell sind Primärisolate durch eine höhere Glykosylierung und eine höhere räumliche Dichte von gp120 schwieriger zu neutralisieren als Laborisolate (Binley *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 1995a; Moore und Ho, 1995b; York *et al.*, 2001). Die in Veröffentlichungen als kreuzneutralisierend beschriebenen humanen monoklonalen Antikörper 2F5 und b12 konnten J27 deutlich schlechter bzw. gar nicht neutralisieren. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass es sich bei diesen beiden Antikörpern um starke kreuzneutralisierende Antikörper handelt, deren Wirksamkeit von R I.23 B/3 in diesem Fall sogar übertroffen wurde. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu erwähnen, dass sich die V3-Domäne von BH10 in elf Aminosäuren von der V3-Domäne von J27 unterscheidet. Dies macht es unwahrscheinlich, dass R I.23 B/3 gegen ein Epitop gerichtet ist, welches in der V3-Domäne liegt.

Es wurde durch die Generierung des Antikörpers R I.23 B/3, welcher kreuzneutralisierende Tendenzen besitzt, gezeigt, dass im Env^{Fus}-Vakzin eventuell neue und interessante Epitope enthalten sind. Bei umfassenden Recherchen in der *HIV-Molecular-Immunology-Database* (www.hiv.lanl.gov/content/immunology/ab_search, Stand 2005) wurden keine weiteren Antikörper gefunden die, wie R I.23 B/3, nach Vakzinierungen in Versuchstieren hergestellt wurden und ein Primärisolat neutralisieren können. Zudem gibt es eine nur sehr geringe Anzahl von Publikationen zu monoklonalen Antikörpern aus Ratten mit neutralisierenden Eigenschaften gegen homologes Virus. Noch anstehende Untersuchungen betreffen Neutralisationsexperimente mit R I.23 B/3 und weiteren HIV-1-Labor- und Primärisolaten.

5.8 Einordnung der Ergebnisse

Trotz dieser positiven Aspekte ist die induzierte Immunantwort von einer sterilen Immunität weit entfernt. Allerdings distanzieren sich einige Wissenschaftler von der Auffassung, diese in naher Zeit auch tatsächlich erreichen zu können. Es zeichnet sich vielmehr eine Tendenz in der wissenschaftlichen Forschung ab, sich „nur“ auf die Induktion einer Immunantwort zu konzentrieren, welche eine Kontrolle der Virämie bewirkt. Diese kontrollierte Infektion könnte passiv zu einem verlangsamten Krankheitsverlauf oder einem völligen Ausbleiben des Krankheitsstadiums AIDS und zu einer geringeren Übertragbarkeit führen (Quinn *et al.*, 2000). Mit Spannung werden in diesem Zusammenhang Ergebnisse von klinischen Studien der Phase I und II erwartet, in denen eine partiell schützende ZTL-Immunantwort durch

rekombinante Viren bzw. DNA-Vakzine indiziert werden soll. Unter genau kontrollierten Versuchsbedingungen sollen hierbei Erkenntnisse zum Krankheitsverlauf und zur Übertragbarkeit erhalten werden.

Recherchen auf der Homepage der *international AIDS vaccine initiative* (IAVI) (www.iavi.org, Stand 2005) ergeben, dass im Moment weltweit ca. 30 Phase I- und II- Vakzinierungsstudien mit dem hauptsächlichen Ziel der Induktion von ZTLs laufen, während nur wenige Phase I und II Vakzinierungsstudien mit einem Schwerpunkt auf der Induktion neutralisierender Antikörper durchgeführt werden. Derzeit wird eine Phase III-Studie zur Induktion einer überwiegend humoralen Immunantwort durchgeführt.

Trotz eines gewissen Vorbehalts wird jedoch auch weiterhin in präklinischen Untersuchungen mit Nachdruck versucht, kreuzneutralisierende Antikörper mit einem Vakzin zu induzieren. Dabei werden unter anderem folgende Strategien verfolgt: Zum einen wird versucht, die native Struktur des Env-Trimers nachzuahmen. Das wird entweder durch rekombinante Proteine oder durch Proteine auf der Oberfläche von Pseudovirionen oder Proteoliposomen erreicht (Grundner *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002b; Yang *et al.*, 2001). Zudem wird versucht, Env-Moleküle mit einer erhöhten Anzahl neutralisierender Epitope durch die Deletion von variablen Domänen (Srivastava *et al.*, 2003) und die Eliminierung von Kohlehydratanteilen herzustellen. In einer weiteren Strategie werden Peptide verwendet, deren Aminosäuresequenz der Sequenz von Epitopen kreuzneutralisierender Antikörper entspricht. Eine weitere, auch in dieser Arbeit verwendeten Strategie versucht, durch die Generierung stabiler Zwischenphasen des Fusionsprozesses konservierte Epitope zu präsentieren (Fouts *et al.*, 2002).

Wie bereits beschrieben, verhinderte der passive Transfer sowohl von polyklonalen neutralisierenden Antikörpern (Shibata *et al.*, 1999) als auch von monoklonalen neutralisierenden (Emini *et al.*, 1992; Gauduin *et al.*, 1995) oder kreuzneutralisierenden Antikörpern (Gauduin *et al.*, 1997; Mascola *et al.*, 2000) teilweise HIV-1- oder SHIV-Infektionen nach *challenge*-Experimenten in verschiedenen Versuchstieren. Erst kürzlich wurde die Wirksamkeit kreuzneutralisierender Antikörper auch in Menschen bewiesen. Es wurde gezeigt, dass die Applikation eines Gemischs kreuzneutralisierender Antikörper (2G12, 2F5, 4E10) nach der Beendigung einer antiretroviralen Behandlung in einigen der Patienten zu einer verzögerten und abgeschwächten Virämie führte (Trkola *et al.*, 2005). Es wird auch weiterhin angenommen, dass kreuzneutralisierende Antikörper HIV-1-Primärinfektionen verhindern könnten, weshalb es nach wie vor ein Ziel ist, solche Antikörper durch ein Vakzin zu induzieren. Eine aktuelle Studie liefert zum einen den Hinweis dafür, warum solche Antikörper durch Vakzine bisher nicht hervorgerufen wurden und zeigt zum anderen die Relevanz des in dieser Arbeit generierten monoklonalen Antikörpers. Haynes *et al.* zeigen, dass die Antikörper 2F5 und 4E10 autoreaktiv sind (Haynes *et al.*, 2005), was

möglicherweise eine Erklärung dafür ist, warum man bisher nicht in der Lage war, kreuzneutralisierende Antikörper mit einem Vakzin zu induzieren. Autoreaktive B-Zellklone werden nämlich normalerweise durch klonale Deletion und Rezeptor-*Editing* noch im unreifen Stadium beseitigt.

Dass es in dieser Arbeit trotz dieser Tatsachen gelungen ist, den Mab R I.23 B/3 mit einer Neutralisationskapazität für ein heterologes Primärisolat zu generieren, ist beachtlich. Außerdem wurden in vakzinierten Ratten neutralisierende Antikörper im Serum induziert. Insgesamt betrachtet liegt in der durch das Env^{Fus}-Vakzin induzierten humoralen Immunantwort die Hoffnung, dass Verbesserungen und Modifikationen der hier verwendeten Strategie in Zukunft zur Induktion von stärkeren und wirksameren, und somit nützlichen, neutralisierenden Antikörpern führen.

5.9 Ausblick

In nachfolgenden Untersuchungen sollen nun PV-Präparationen mit einem signifikant erhöhten Env-Einbau verwendet werden. Kürzlich ist in unserer Arbeitsgruppe ein Env-Protein mit einer spezifischen Mutation in der zytoplasmatischen Domäne beschrieben worden (Holtkotte *et al.*, 2005, im Druck), welches zwei- bis dreimal effizienter in Pseudovirionen inkorporiert wird als nicht trunkiertes Wt-Env. Dieses Konstrukt soll zukünftig zur Anwendung kommen.

Folgender Ansatz zielt ebenfalls auf einen erhöhten Env-Einbau: Bisher generierte Env-PV wurden durch eine Kotransfektion von einem Verpackungskonstrukt mit einem Expressionsplasmid für das Env-Gen hergestellt. In dieser Konstellation ist die Menge an in Pseudovirionen eingebautem Env-Protein variabler und meist schlechter als bei der Expression sämtlicher HIV-1-Gene von einem einzelnen Plasmid. Deswegen sollen für die Herstellung künftiger PV-Präparationen Plasmide verwendet werden, die sowohl für Env-Proteine als auch für die Strukturproteine kodieren. In weiteren Immunisierungsexperimenten soll zudem die Gesamtmenge an Pseudovirionen (jetzt mit verbessertem Env-Einbau) um den Faktor vier erhöht werden. All diese Maßnahmen sollen dazu führen, dass in zukünftigen Immunisierungen mit PV-Vakzin ca. 10-20-mal mehr Env-Protein vorhanden sein wird als bei den in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungen. Es ist zu hoffen, dass dadurch auch die Menge an neuen konformationellen Env-Epitopen entsprechend erhöht sein wird. Abhängig von den Ergebnissen dieser Immunisierungsexperimente sollen gegebenenfalls weitere Strategien vorangetrieben werden, z.B. die Anwendung von Liposomen (Devesa *et al.*, 2002), die intermediäre Env-Konformationen präsentieren.

6 ANHANG

6.1 Partikelimmunfluoreszenz

Zur Analyse der interviralen Membranfusion wurde auch die Anwendung der so genannten Partikelimmunfluoreszenz (PIF) in Betracht gezogen (Pizzato *et al.*, 1999). Dabei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Pseudovirionen direkt auf Objektträger gebunden, mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern inkubiert und somit sichtbar gemacht werden. Dies ermöglicht den Nachweis sowohl von Kapsidproteinen als auch von Oberflächenmolekülen wie trunkiertem EGFR (TrEGFR) und Env. Die Auswertung erfolgt unter dem konfokalen Mikroskop. Die sichtbaren Signale entsprechen dabei nicht den Pseudovirionen selbst, sondern Lichtkegeln, die durch gebundene fluoreszierende Antikörper hervorgerufen werden. Nachdem die Methode etabliert wurde, sollten Env^{WT}- oder Env^{Fus}-PV in ersten Analysen mit sCD4 und in weiteren Experimenten mit CD4/X4-PV vermischt werden. Diese Ansätze sollten anschließend auf die Anzahl fusionierter PV-Strukturen untersucht werden, die anhand von Antikörpern gegen CD4-induzierte (17b, CG10) oder gegen fusionsspezifische Epitope (A32, 48d) ermittelt werden sollten. Damit sollten nicht fusionierte Pseudovirionen (CA-Signal) von fusionierten Strukturen (CA-Signale *und* Signale gegen induzierte Env-Epitope) unterschieden werden.

Die bisher beschriebene Methode der Luziferasegentransduktion erfasst nur jene fusionierten Strukturen, die weiterhin infektiös sind. Die Methode des Epitop-ELISAs (siehe 5.4.3) zeigt ausschließlich, dass neue Epitope exponiert werden, sagt aber nichts über die tatsächlichen Mengen fusionierter Strukturen aus. Dieser Nachweis sollte mit der PIF durchgeführt werden, wozu die Methode allerdings zuvor etabliert werden musste:

Hierfür wurden Pseudovirionen mit eingebautem TrEGFR (EGFR-PV) wie unter 3.6.2 beschrieben auf Objektträger aufgebracht, und TrEGFR und Kapsidprotein (CA) der Pseudovirionen durch Antikörper nachgewiesen. Die Ergebnisse sind in Abb.6.1, A dargestellt.

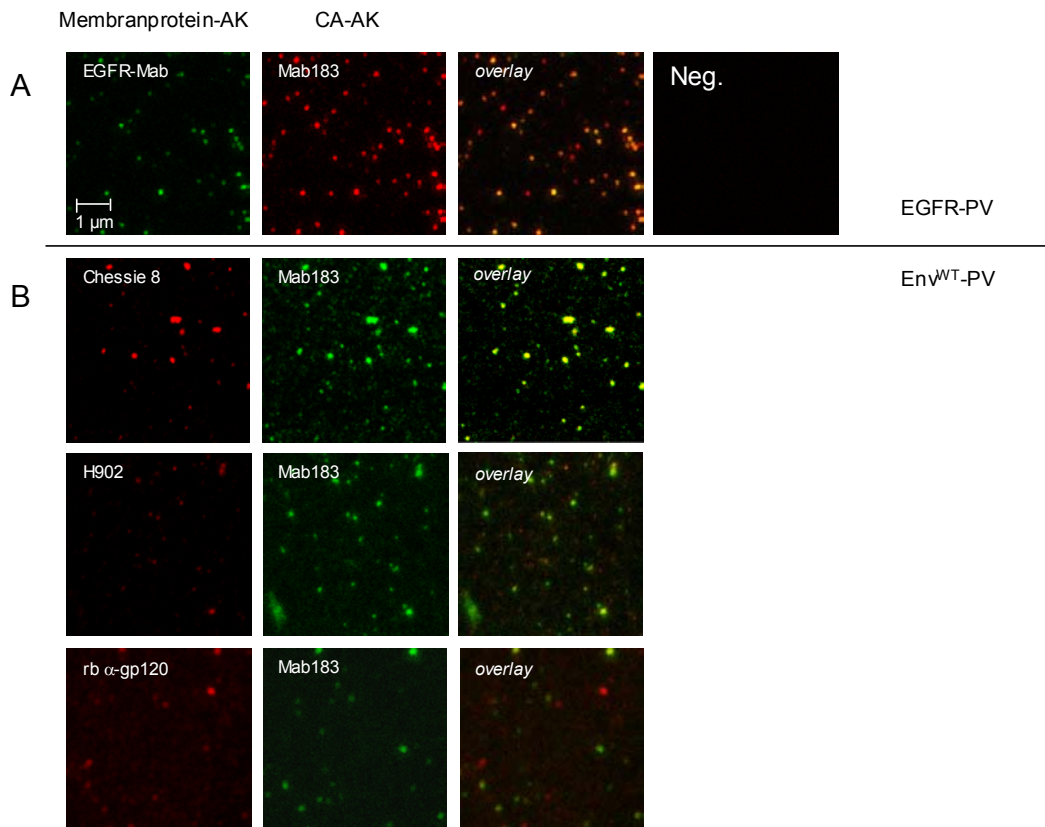


Abb. 6.1: Partikelimmunfluoreszenzen von EGFR- und Env^{WT}-PV mit verschiedenen Antikörpern.

Maßstab siehe Bild links oben. Detaillierte Erläuterungen im Text.

Abb. 6.1, A zeigt deutliche Signale von einheitlicher Größe für beide Proteine (TrEGFR, CA). Keine Signale gibt es dagegen in der Negativkontrolle, wo unter ansonsten identischen Bedingungen der jeweilige Erstantikörper nicht zugegeben wurde. Im *overlay* des Nachweises von TrEGFR und CA sind ca. 60% der Signale doppelpositiv für beide Proteine. Die restlichen ca. 40% sind ausschließlich für CA positiv. Für TrEGFR allein gibt es keine Signale. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen und unterstreicht somit die Zuverlässigkeit der Methode. Es macht zudem deutlich, dass die EGFR-PV-Präparation nicht durch sichtbare TrEGFR enthaltende Membranvesikel kontaminiert ist.

Nach diesen Erfolg versprechenden Versuchen wurde die PIF mit Env^{WT}-PV durchgeführt, was jedoch nicht die erhofften Resultate erbrachte. Abb. 6.1, B zeigt eine Auswahl durchgeführter Analysen mit Env- (Chessie 8, H902 oder rb α-gp120) und CA- (Mab183) Antikörpern. Bei der Verwendung von Chessie 8 erschienen sehr heterogene Signale, wobei zudem 100% der CA-Signale auch positiv für Env waren (*overlay*). Dieses Resultat wurde kritisch betrachtet, da Chessie 8 gegen den C-terminalen Bereich von gp41 gerichtet ist (und somit kein Signal geben sollte) und selbst bei einer permeabilisierten Virusmembran nicht davon ausgegangen werden konnte, dass in wirklich jedes Env-PV auch Env eingebaut wird. Dies ist insbesondere unwahrscheinlich, wenn Pseudovirionen, wie in dieser Arbeit, in einer Kotransfektion hergestellt wurden, was wiederum eine Aufnahme von zwei

Expressionskonstrukten in jede transfizierte Zelle voraussetzen würde. Die Negativkontrolle bestand erneut aus einer Partikelpräparation, zu welcher der Primärantikörper nicht zugegeben wurde. Es waren wie bei den EGFR-PV keine Signale zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Weitere Schwierigkeiten ergaben sich bei der Verwendung des H902-Antikörpers. Das erhaltene Env-Signal war nur sehr schwach, wodurch die Auswertung erschwert wurde. Es kann nur vermutet werden, dass auch hier 100% der CA-Signale ebenso für Env positiv sind. Bei polyklonalen α -gp120-Antikörpern aus Kaninchen wurden sowohl Einzelsignale für CA und Env als auch Doppelsignale detektiert. Dieses Phänomen ist nur schwer zu erklären, da es als sehr unwahrscheinlich erachtet wurde, dass es zu einer derartigen Vesikelkontamination kommt (siehe EGFR-PV).

Sämtliche in Abb. 6.1, B gezeigten Aufnahmen stammen aus einem Experiment. Dabei war die Intensität der Env-Signale im direkten Vergleich zu den TrEGFR-Signalen von Abb. 6.1, A um ein Vielfaches niedriger, was mittels der erforderlichen Sensitivität des konfokalen Mikroskops eindeutig belegt werden konnte. Dies lässt vermuten, dass die geringe Menge an Env-Proteinen in Pseudovirionen für die Anwendbarkeit dieser Methode nicht ausreicht. Schwache Signale verstärken das Problem der Überstrahlung von dem Kanal des Fluorochroms mit starker Intensität in den Kanal des Fluorochroms mit schwacher Intensität. In weiteren Experimenten mit Env-spezifischen monoklonalen Antikörpern fielen zudem die Fluoreszenzen so niedrig aus, dass keine Signale zu erkennen waren.

In Anbetracht der geringen Env-Fluoreszenz in Verbindung mit den unerwarteten Ergebnissen der 100%igen Env-Positivität der Pseudovirionen (bzw. der Env-Signale ohne korrespondierendes CA-Signal bei polyklonalen Antikörpern) sowie einer Variabilität der Ergebnisse, erwies sich die PIF für die Anforderungen dieser Arbeit als ungeeignet. Die Quantifizierung der fusionierten Strukturen beschränkt sich somit weiterhin auf die Analyse der noch infektiösen fusionierten Strukturen in der Luziferasegentransduktion.

6.2 pcDNA-X4-IRES-CD4 - Klonierungsstrategie und Charakteristika

Es wurde versucht, die Expression von CD4 und CXCR-4 von einem einzigen bizistronischen Plasmid möglich zu machen. Bisher war es bei der Herstellung der CD4/X4-PV notwendig, drei Plasmide mittels Kalzium-Phosphat-Transfektion in 293T-Zellen einzubringen. Dabei handelte es sich um das partikelbildende Konstrukt und die Expressionskonstrukte für CD4 und CXCR-4. Im Falle einer erfolgreichen Klonierung von pcDNA-X4-IRES-CD4 und der Expression von ausreichend großen Mengen der beiden Proteine wäre ausschließlich die Aufnahme von zwei Plasmiden bei der Kalzium-Phosphat-Transfektion erforderlich gewesen, was vorteilhaft gegenüber der Kotransfektion mit drei

Plasmiden gewesen wäre. Das klonierte Konstrukt führte allerdings ausschließlich zu einer starken Expression von CXCR-4, welches in transfizierten Zellen durch eine Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Anschließende Analysen bestätigten die Funktionalität der IRES in einem Plasmid, das von pcDNA-X4-IRES-CD4 abgeleitet war. Somit kann nur angenommen werden, dass die Positionierung des CD4-Gens hinter der IRES zu einer nur sehr niedrigen und nicht detektierbaren Expression von CD4-Protein führt.

Die Klonierung im Einzelnen:

Der Vektor p76 (Bluescript M13) wurde mittels eines *EcoRI* / *XhoI*-Verdaus linearisiert und mit dem IRES-tat-Fragment aus Plasmid p583, das ebenfalls durch *EcoRI* und *XhoI* geschnitten wurde, ligiert. Aus dem erhaltenen Plasmid lässt sich die IRES-Sequenz mit *NotI* und *NcoI* herausschneiden und isolieren.

Die Sequenz von CD4 wurde mittels PCR mit p253 als Matrize wie unter 3.2.10 beschrieben amplifiziert. Bei den verwendeten *Primern* handelte es sich um die *Oligos* 290 und 291 (laborinterne Nummerierung):

Oligo 290 (Sinn):

5' GGCAAGGCCACC***ATGG***ACCGGGGAGTCCC 3'

Die Sequenz der *NcoI*-Restriktionsschnittstelle ist fett hervorgehoben. *Mismatch*-Basen sind mit * und das Startkodon mit einem Pfeil markiert.

Oligo 291 (Gegensinn):

5' AACTTATGCTCGAGCGTGCCTCAAATGGGGCTACATG 3'

Die Sequenz der *XhoI*-Restriktionsschnittstelle ist fett hervorgehoben. Der unterstrichene Bereich ist zur Plasmid-DNA nicht komplementär.

Bei der Wahl des Sinn-*Oligos* wird ersichtlich, dass es im Bereich des Startkodons bewusst zu einer Modifikation der Sequenz und somit zur Einführung einer *NcoI*-Schnittstelle kommt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde anschließend mit *NcoI* und *XhoI* geschnitten und isoliert.

Die Sequenz der IRES (*NotI* und *NcoI*) und die Sequenz von CD4 (*NcoI* und *XhoI*) wurden nun in einer 3-Fragmente-Ligation mit dem durch *NotI* und *XhoI*-linearisierten Vektor pcDNA-CXCR-4 (p407) ligiert.

6.3 Berechnung der Anzahl der Env-Trimere und CD4-Proteine in Pseudovirionen

Env^{WT}-PV: 100-200 ng gp120-Protein in 10000 ng CA entsprechen einem Mengenverhältnis von 1-2 ng gp120 pro 100 ng CA und einer Anzahl (molare Masse 120 kDa / 24 kDa = 5) von 2-4 gp120-Monomeren pro 1000 Moleküle CA. Das molare gp120/CA-Verhältnis liegt demnach zwischen 1:500 und 1:250.

Env^{Fus}-PV: 200-400 ng gp120-Protein in 10000 ng CA entsprechen einem Mengenverhältnis von 2-4 ng gp120 pro 100 ng CA und einer Anzahl (molare Masse 120 kDa / 24 kDa = 5) von 4-8 gp120-Monomeren pro 1000 Moleküle CA. Das molare gp120/CA-Verhältnis liegt demnach zwischen 1:250 und 1:125.

CD4/X4-PV: 200-700 ng CD4-Protein in 10000 ng CA entsprechen einem Mengenverhältnis von 2-7 ng CD4 pro 100 ng CA und einer Anzahl (molare Masse 55 kDa / 24 kDa = 2,3) von 9-30 CD4-Proteinen pro 1000 Moleküle CA. Das molare CD4/CA-Verhältnis liegt zwischen 1:115 und 1:30.

6.4 Abkürzungen

α	anti
*	Vorimmunisierung mit gp120- und gp41-Protein
°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
ART	<i>antiretroviral treatment</i>
AS	Aminosäure
β-Gal.	β-Galaktosidase
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CA	Kapsidprotein (<i>capsid</i>)
CCR5	<i>chemokine (C-C motif) receptor 5</i>
CD4/X4-PV	Pseudovirionen mit eingebautem CD4 und CXCR-4
CD4-PV	Pseudovirionen mit eingebautem CD4
CHO	Chinese hamster ovary
cm	Zentimeter
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CT	C-Terminus
CXCR-4	<i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
Da	Dalton

DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Env	Virales Hüllglykoprotein (<i>envelope</i>)
Env ^{Fus-} -PV	Pseudovirionen mit eingebautem mutierten Env im gp41-FP
Env ^{Fus-} -Vakzin	genetisch fixierte Env ^{Fus-} -PV-CD4/X4-PV-Mischung
Env-PV	Env ^{WT} - und Env ^{Fus-} -PV
Env ^{WT} -PV	Pseudovirionen mit eingebautem Wildtyp-Env
Env ^{WT} -Vakzin	chemisch fixierte Env ^{WT} -PV-CD4/X4-PV-Mischung
EP	Elektrophorese
Epo	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FCS	Fetales Kälberserum, <i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FK	Fusionskinetik
FP	Fusionspeptid
Fus-	HIV-1-Env (BH10) Fus ⁻
g	Gramm
GA	Glutaraldehyd
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
gp	Glykoprotein
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
HBS	HEPES <i>buffered saline</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPLC	<i>high pressure liquide chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
hu	<i>human</i>
IE	<i>immediate early</i>
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
im	intramuskulär
IN	Integrase
ip	intraperitoneal
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
IU	<i>infectious units</i>
iv	intravenös
k	Kilo bzw. komplettiert
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Broth
LP	Laufpuffer

LTR	<i>long terminal repeat</i>
Luzi	Luziferase
m	Milli
M	molar
MA	Matrixprotein
Mab	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
mo	Maus (<i>mouse</i>)
M-trop	HIV-Makrophagenlinie
mut.	mutiert/Mutation
n	nano
NC	Nukleokapsidprotein (<i>nucleocapsid</i>)
nm	Nanometer
NMS	<i>normal mouse serum</i>
NRS	<i>normal rat serum</i>
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	Plasmid
p.t.	<i>post transfection</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
p24	HIV-1 Kapsidprotein
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pell.	Pellet (Niederschlag)
PIC	<i>preintegration complex</i>
PIF	Partikelimmunfluoreszenz
<i>pol</i>	Polymerase-Gen
POX	Peroxidase
PP	Polypropylen
Pr	<i>precursor</i>
PR	Protease
PS	Polystyrol
PV	Pseudovirion
rb	<i>rabbit</i>
RLA	Relative Luziferaseaktivität
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Roosevelt Park Memorial Institute
RRE	<i>rev response element</i>
RT	Reverse Transkriptase
SB	<i>sample buffer</i>
sc	subkutan
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SP	Signalpeptid
Tab.	Tabelle
TAR	<i>Trans-activation response</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

TMB	3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidin
TMD	Transmembrandomäne
tpa	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
T-trop	HIV-T-Zelllinie
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VE	voll entsalzt
VLP	<i>virus like particle</i>
VN	Virusneutralisation
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-G	Glykoprotein des <i>vesicular stomatitis virus</i>
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organization</i>
Wt	Wildtyp
X-Gal.	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid
ZTL	zytotoxische T-Lymphozyten

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abacioglu, Y. H., Fouts, T. R., Laman, J. D., Claassen, E., Pincus, S. H., Moore, J. P., Roby, C. A., Kamin-Lewis, R., and Lewis, G. K. (1994). Epitope mapping and topology of baculovirus-expressed HIV-1 gp160 determined with a panel of murine monoclonal antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(4), 371-81.
- Ahmad, N., and Venkatesan, S. (1988). Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **241**(4872), 1481-5.
- Andreassen, H., Bohr, H., Bohr, J., Brunak, S., Bugge, T., Cotterill, R. M., Jacobsen, C., Kusk, P., Lautrup, B., Petersen, S. B., and et al. (1990). Analysis of the secondary structure of the human immunodeficiency virus (HIV) proteins p17, gp120, and gp41 by computer modeling based on neural network methods. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(6), 615-22.
- Baba, T. W., Jeong, Y. S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M. F., and Ruprecht, R. M. (1995). Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* **267**(5205), 1820-5.
- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., Stiegler, G., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., Schmidt, R., Hill, L. R., Keeling, M. E., Lu, Y., Wright, J. E., Chou, T. C., and Ruprecht, R. M. (2000). Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**(2), 200-6.
- Barouch, D. H., Santra, S., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Plishka, R., Buckler-White, A., Gaitan, A. E., Zin, R., Nam, J. H., Wyatt, L. S., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Moss, B., Montefiori, D. C., Hirsch, V. M., and Letvin, N. L. (2001). Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *J Virol* **75**(11), 5151-8.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**(4599), 868-71.

- Berkhout, B., Verhoef, K., van Wamel, J. L., and Back, N. K. (1999). Genetic instability of live, attenuated human immunodeficiency virus type 1 vaccine strains. *J Virol* **73**(2), 1138-45.
- Berman, P. W., Gregory, T. J., Riddle, L., Nakamura, G. R., Champe, M. A., Porter, J. P., Wurm, F. M., Hershberg, R. D., Cobb, E. K., and Eichberg, J. W. (1990). Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* **345**(6276), 622-5.
- Bieniasz, P. D., and Cullen, B. R. (2000). Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *J Virol* **74**(21), 9868-77.
- Binley, J. M., Sanders, R. W., Clas, B., Schuelke, N., Master, A., Guo, Y., Kajumo, F., Anselma, D. J., Maddon, P. J., Olson, W. C., and Moore, J. P. (2000). A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric virion-associated structure. *J Virol* **74**(2), 627-43.
- Binley, J. M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M. B., Wang, M., Chappey, C., Stiegler, G., Kunert, R., Zolla-Pazner, S., Katinger, H., Petropoulos, C. J., and Burton, D. R. (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol* **78**(23), 13232-52.
- Blumenthal, R., Gallo, S. A., Viard, M., Raviv, Y., and Puri, A. (2002). Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion. *Chem Phys Lipids* **116**(1-2), 39-55.
- Boge, M., Wyss, S., Bonifacino, J. S., and Thali, M. (1998). A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor. *J Biol Chem* **273**(25), 15773-8.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **68**(9), 6103-10.
- Bosch, V., and Pawlita, M. (1990). Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *J Virol* **64**(5), 2337-44.
- Boyer, J. D., Wang, B., Ugen, K. E., Agadjanyan, M., Javadian, A., Frost, P., Dang, K., Carrano, R. A., Ciccarelli, R., Coney, L., Williams, W. V., and Weiner, D. B. (1996). In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *J Med Primatol* **25**(3), 242-50.

- Brenchley, J. M., Schacker, T. W., Ruff, L. E., Price, D. A., Taylor, J. H., Beilman, G. J., Nguyen, P. L., Khoruts, A., Larson, M., Haase, A. T., and Douek, D. C. (2004). CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**(6), 749-59.
- Briggs, J. A., Simon, M. N., Gross, I., Krausslich, H. G., Fuller, S. D., Vogt, V. M., and Johnson, M. C. (2004). The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat Struct Mol Biol* **11**(7), 672-5.
- Broliden, P. A., von Gegerfelt, A., Clapham, P., Rosen, J., Fenyo, E. M., Wahren, B., and Broliden, K. (1992). Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(2), 461-5.
- Brown, D. A., and London, E. (1998). Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 111-36.
- Browning, J., Horner, J. W., Pettoello-Mantovani, M., Raker, C., Yurasov, S., DePinho, R. A., and Goldstein, H. (1997). Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(26), 14637-41.
- Bryant, M., and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(2), 523-7.
- Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, W., Trkola, A., Purtscher, M., Gruber, G., Tauer, C., Steindl, F., Jungbauer, A., and et al. (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(4), 359-69.
- Bugelski, P. J., Ellens, H., Hart, T. K., and Kirsh, R. L. (1991). Soluble CD4 and dextran sulfate mediate release of gp120 from HIV-1: implications for clinical trials. *J Acquir Immune Defic Syndr* **4**(9), 923-4.
- Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., Lewis, P., Goldfarb, D., Emerman, M., and Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**(6447), 666-9.

- Burton, D. R., Pyati, J., Koduri, R., Sharp, S. J., Thornton, G. B., Parren, P. W., Sawyer, L. S., Hendry, R. M., Dunlop, N., Nara, P. L., and et al. (1994). Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**(5187), 1024-7.
- Bynum, J., Andrews, J. L., Ellis, B., Kull, F. C., Jr., Austin, E. A., and Kilpatrick, K. E. (1999). Development of class-switched, affinity-matured monoclonal antibodies following a 7-day immunization schedule. *Hybridoma* **18**(5), 407-11.
- Cann, A. J., Zack, J. A., Go, A. S., Arrigo, S. J., Koyanagi, Y., Green, P. L., Pang, S., and Chen, I. S. (1990). Human immunodeficiency virus type 1 T-cell tropism is determined by events prior to provirus formation. *J Virol* **64**(10), 4735-42.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D. D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **332**(4), 201-8.
- Carlson, J. R., McGraw, T. P., Keddle, E., Yee, J. L., Rosenthal, A., Langlois, A. J., Dickover, R., Donovan, R., Luciw, P. A., Jennings, M. B., and et al. (1990). Vaccine protection of rhesus macaques against simian immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**(11), 1239-46.
- Chakrabarti, B. K., Kong, W. P., Wu, B. Y., Yang, Z. Y., Friborg, J., Ling, X., King, S. R., Montefiori, D. C., and Nabel, G. J. (2002). Modifications of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein enhance immunogenicity for genetic immunization. *J Virol* **76**(11), 5357-68.
- Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M., and Kim, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**(2), 263-73.
- Chan, W. E., Lin, H. H., and Chen, S. S. (2005). Wild-type-like viral replication potential of human immunodeficiency virus type 1 envelope mutants lacking palmitoylation signals. *J Virol* **79**(13), 8374-87.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A. N., Suss-Toby, E., Nora, E., and Zimmerberg, J. (1994). An amphipathic peptide from the C-terminal region of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein causes pore formation in membranes. *J Virol* **68**(11), 7115-23.

- Chertova, E., Bess Jr, J. W., Jr., Crise, B. J., Sowder, I. R., Schaden, T. M., Hilburn, J. M., Hoxie, J. A., Benveniste, R. E., Lifson, J. D., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (2002). Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol* **76**(11), 5315-25.
- Chesebro, B., and Wehrly, K. (1988). Development of a sensitive quantitative focal assay for human immunodeficiency virus infectivity. *J Virol* **62**(10), 3779-88.
- Chesebro, B., Buller, R., Portis, J., and Wehrly, K. (1990). Failure of human immunodeficiency virus entry and infection in CD4-positive human brain and skin cells. *J Virol* **64**(1), 215-21.
- Chesebro, B., Wehrly, K., Nishio, J., and Perryman, S. (1992). Macrophage-tropic human immunodeficiency virus isolates from different patients exhibit unusual V3 envelope sequence homogeneity in comparison with T-cell-tropic isolates: definition of critical amino acids involved in cell tropism. *J Virol* **66**(11), 6547-54.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C., and et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**(4761), 343-6.
- Clavel, F., and Orenstein, J. M. (1990). A mutant of human immunodeficiency virus with reduced RNA packaging and abnormal particle morphology. *J Virol* **64**(10), 5230-4.
- Cleveland, S. M., McLain, L., Cheung, L., Jones, T. D., Hollier, M., and Dimmock, N. J. (2003). A region of the C-terminal tail of the gp41 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 contains a neutralizing epitope: evidence for its exposure on the surface of the virion. *J Gen Virol* **84**(Pt 3), 591-602.
- Cohen, E. A., Terwilliger, E. F., Jalinoos, Y., Proulx, J., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1990). Identification of HIV-1 vpr product and function. *J Acquir Immune Defic Syndr* **3**(1), 11-8.
- Cohen, J. (2003). Public health. AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. *Science* **299**(5611), 1290-1.
- Cohen, J. R., and Fox, S. (2003). Developing a new faculty practice plan with a model for funds flow between the hospital and the plan. *Acad Med* **78**(2), 119-24.

- Conley, A. J., Kessler, J. A., 2nd, Boots, L. J., Tung, J. S., Arnold, B. A., Keller, P. M., Shaw, A. R., and Emini, E. A. (1994). Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(8), 3348-52.
- Conley, A. J., Kessler, J. A., II, Boots, L. J., McKenna, P. M., Schleif, W. A., Emini, E. A., Mark, G. E., III, Katinger, H., Cobb, E. K., Luncford, S. M., Rouse, S. R., and Murthy, K. K. (1996). The consequence of passive administration of an anti-human immunodeficiency virus type 1 neutralizing monoclonal antibody before challenge of chimpanzees with a primary virus isolate. *J Virol* **70**(10), 6751-8.
- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., and Desrosiers, R. C. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* **258**(5090), 1938-41.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**(6584), 661-6.
- Derdeyn, C. A., Decker, J. M., Sfakianos, J. N., Wu, X., O'Brien, W. A., Ratner, L., Kappes, J. C., Shaw, G. M., and Hunter, E. (2000). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol* **74**(18), 8358-67.
- Devesa, F., Chams, V., Dinadayala, P., Stella, A., Ragas, A., Auboiroux, H., Stegmann, T., and Poquet, Y. (2002). Functional reconstitution of the HIV receptors CCR5 and CD4 in liposomes. *Eur J Biochem* **269**(21), 5163-74.
- Doms, R. W., and Trono, D. (2000). The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. *Genes Dev* **14**(21), 2677-88.
- Douek, D. C., Brenchley, J. M., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Okamoto, Y., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Kunstman, K., Wolinsky, S., Grossman, Z., Dybul, M., Oxenius, A., Price, D. A., Connors, M., and Koup, R. A. (2002). HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T cells. *Nature* **417**(6884), 95-8.
- Earl, P. L., Moss, B., and Doms, R. W. (1991). Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **65**(4), 2047-55.

- Ellerman, V., and Bang, O. (1908). Experimentelle Leukämie bei Hühnern. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig.* **46**, 595-609.
- Emini, E. A., Schleif, W. A., Nunberg, J. H., Conley, A. J., Eda, Y., Tokiyoshi, S., Putney, S. D., Matsushita, S., Cobb, K. E., Jett, C. M., and et al. (1992). Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody. *Nature* **355**(6362), 728-30.
- Endres, M. J., Jaffer, S., Haggarty, B., Turner, J. D., Doranz, B. J., O'Brien, P. J., Kolson, D. L., and Hoxie, J. A. (1997). Targeting of HIV- and SIV-infected cells by CD4-chemokine receptor pseudotypes. *Science* **278**(5342), 1462-4.
- EU (1995). Protection of macaques against simian immunodeficiency virus infection with inactivated vaccines: comparison of adjuvants, doses and challenge viruses. The European Concerted Action on 'Macaque Models for AIDS Research'. *Vaccine* **13**(3), 295-300.
- Finnegan, C. M., Berg, W., Lewis, G. K., and DeVico, A. L. (2001). Antigenic properties of the human immunodeficiency virus envelope during cell-cell fusion. *J Virol* **75**(22), 11096-105.
- Fischer, U., Meyer, S., Teufel, M., Heckel, C., Luhrmann, R., and Rautmann, G. (1994). Evidence that HIV-1 Rev directly promotes the nuclear export of unspliced RNA. *Embo J* **13**(17), 4105-12.
- Fouts, T., Godfrey, K., Bobb, K., Montefiori, D., Hanson, C. V., Kalyanaraman, V. S., DeVico, A., and Pal, R. (2002). Crosslinked HIV-1 envelope-CD4 receptor complexes elicit broadly cross-reactive neutralizing antibodies in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18), 11842-7.
- Freed, E. O., Myers, D. J., and Risser, R. (1990). Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(12), 4650-4.
- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J Virol* **69**(3), 1984-9.

- Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**(1), 341-51.
- Frey, S., Marsh, M., Gunther, S., Pelchen-Matthews, A., Stephens, P., Orllepp, S., and Stegmann, T. (1995). Temperature dependence of cell-cell fusion induced by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**(3), 1462-72.
- Fu, Y. K., Hart, T. K., Jonak, Z. L., and Bugelski, P. J. (1993). Physicochemical dissociation of CD4-mediated syncytium formation and shedding of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol* **67**(7), 3818-25.
- Gabuzda, D. H., Lever, A., Terwilliger, E., and Sodroski, J. (1992). Effects of deletions in the cytoplasmic domain on biological functions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *J Virol* **66**(6), 3306-15.
- Gallay, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(18), 9825-30.
- Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S., Puri, A., Durell, S., and Blumenthal, R. (2003). The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochim Biophys Acta* **1614**(1), 36-50.
- Gao, F., Yue, L., White, A. T., Pappas, P. G., Barchue, J., Hanson, A. P., Greene, B. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**(6386), 495-9.
- Gao, F., Morrison, S. G., Robertson, D. L., Thornton, C. L., Craig, S., Karlsson, G., Sodroski, J., Morgado, M., Galvao-Castro, B., von Briesen, H., and et al. (1996). Molecular cloning and analysis of functional envelope genes from human immunodeficiency virus type 1 sequence subtypes A through G. The WHO and NIAID Networks for HIV Isolation and Characterization. *J. Virol.* **70**(3), 1651-67.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* **397**(6718), 436-41.

- Gao, F., Li, Y., Decker, J. M., Peyerl, F. W., Bibollet-Ruche, F., Rodenburg, C. M., Chen, Y., Shaw, D. R., Allen, S., Musonda, R., Shaw, G. M., Zajac, A. J., Letvin, N., and Hahn, B. H. (2003). Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**(9), 817-23.
- Garcia, J. V., and Miller, A. D. (1991). Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature* **350**(6318), 508-11.
- Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pornillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., Myszka, D. G., and Sundquist, W. I. (2001). Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* **107**(1), 55-65.
- Gauduin, M. C., Safrit, J. T., Weir, R., Fung, M. S., and Koup, R. A. (1995). Pre- and postexposure protection against human immunodeficiency virus type 1 infection mediated by a monoclonal antibody. *J Infect Dis* **171**(5), 1203-9.
- Gauduin, M. C., Parren, P. W., Weir, R., Barbas, C. F., Burton, D. R., and Koup, R. A. (1997). Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1. *Nat Med* **3**(12), 1389-93.
- Gelderblom, H. R., Hausmann, E. H., Ozel, M., Pauli, G., and Koch, M. A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**(1), 171-6.
- Gelderblom, H. R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *Aids* **5**(6), 617-37.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**(1), 103-12.
- Gorny, M. K., Stamatatos, L., Volsky, B., Revesz, K., Williams, C., Wang, X. H., Cohen, S., Staudinger, R., and Zolla-Pazner, S. (2005). Identification of a new quaternary neutralizing epitope on human immunodeficiency virus type 1 virus particles. *J Virol* **79**(8), 5232-7.

- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Wolf, R. A., and Saxon, A. (1981). Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **305**(24), 1425-31.
- Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(15), 5781-5.
- Groenink, M., Andeweg, A. C., Fouchier, R. A., Broersen, S., van der Jagt, R. C., Schuitemaker, H., de Goede, R. E., Bosch, M. L., Huisman, H. G., and Tersmette, M. (1992). Phenotype-associated env gene variation among eight related human immunodeficiency virus type 1 clones: evidence for in vivo recombination and determinants of cytotropism outside the V3 domain. *J Virol* **66**(10), 6175-80.
- Groenink, M., Moore, J. P., Broersen, S., and Schuitemaker, H. (1995). Equal levels of gp120 retention and neutralization resistance of phenotypically distinct primary human immunodeficiency virus type 1 variants upon soluble CD4 treatment. *J Virol* **69**(1), 523-7.
- Grundner, C., Mirzabekov, T., Sodroski, J., and Wyatt, R. (2002). Solid-phase proteoliposomes containing human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Virol* **76**(7), 3511-21.
- Haas, J., Park, E. C., and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* **6**(3), 315-24.
- Haffar, O. K., Dowbenko, D. J., and Berman, P. W. (1991a). The cytoplasmic tail of HIV-1 gp160 contains regions that associate with cellular membranes. *Virology* **180**(1), 439-41.
- Haffar, O. K., Smithgall, M. D., Moran, P. A., Travis, B. M., Zarling, J. M., and Hu, S. L. (1991b). HIV-specific humoral and cellular immunity in rabbits vaccinated with recombinant human immunodeficiency virus-like gag-env particles. *Virology* **183**(2), 487-95.
- Haigwood, N. L., Watson, A., Sutton, W. F., McClure, J., Lewis, A., Ranchalis, J., Travis, B., Voss, G., Letvin, N. L., Hu, S. L., Hirsch, V. M., and Johnson, P. R. (1996). Passive immune globulin therapy in the SIV/macaque model: early intervention can alter disease profile. *Immunol Lett* **51**(1-2), 107-14.

- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H. D., and Garten, W. (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**(6402), 358-61.
- Hammonds, J., Chen, X., Ding, L., Fouts, T., De Vico, A., zur Megede, J., Barnett, S., and Spearman, P. (2003). Gp120 stability on HIV-1 virions and Gag-Env pseudovirions is enhanced by an uncleaved Gag core. *Virology* **314**(2), 636-49.
- Hart, T. K., Kirsh, R., Ellens, H., Sweet, R. W., Lambert, D. M., Petteway, S. R., Jr., Leary, J., and Bugelski, P. J. (1991). Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6), 2189-93.
- Haynes, B. F., Fleming, J., St Clair, E. W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., Robinson, J., Scearce, R. M., Plonk, K., Staats, H. F., Ortel, T. L., Liao, H. X., and Alam, S. M. (2005). Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**(5730), 1906-8.
- Haynes, J. R., Cao, S. X., Rovinski, B., Sia, C., James, O., Dekaban, G. A., and Klein, M. H. (1991). Production of immunogenic HIV-1 viruslike particles in stably engineered monkey cell lines. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**(1), 17-27.
- He, J., Choe, S., Walker, R., Di Marzio, P., Morgan, D. O., and Landau, N. R. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity. *J Virol* **69**(11), 6705-11.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15), 7311-5.
- Helseth, E., Olshevsky, U., Furman, C., and Sodroski, J. (1991). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol* **65**(4), 2119-23.
- Henriksson, P. (1999). Analyse des Einbaumechanismus viraler und zellulärer Glykoproteine in HIV-1 Partikel, Fakultät für Biologie, Heidelberg, 1999.

- Henriksson, P., Pfeiffer, T., Zentgraf, H., Alke, A., and Bosch, V. (1999). Incorporation of wild-type and C-terminally truncated human epidermal growth factor receptor into human immunodeficiency virus-like particles: insight into the processes governing glycoprotein incorporation into retroviral particles. *J Virol* **73**(11), 9294-302.
- Herrera, A. M., Musacchio, A., Fernandez, J. R., and Duarte, C. A. (2000). Efficiency of erythropoietin's signal peptide for HIV(MN)-1 gp 120 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **273**(2), 557-9.
- Ho, D. D., Sarngadharan, M. G., Hirsch, M. S., Schooley, R. T., Rota, T. R., Kennedy, R. C., Chanh, T. C., and Sato, V. L. (1987). Human immunodeficiency virus neutralizing antibodies recognize several conserved domains on the envelope glycoproteins. *J Virol* **61**(6), 2024-8.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**(6510), 123-6.
- Holtkotte, D., Pfeiffer, T., Pisch, T., and Bosch, V. (2005, im Druck). Selection and characterization of a replication-competent human immunodeficiency virus type I variant encoding C-terminally truncated Env. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
- Jin, X., Bauer, D. E., Tuttleton, S. E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C. E., Safrit, J. T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L. G., Zhang, L., Perelson, A. S., and Ho, D. D. (1999). Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* **189**(6), 991-8.
- Johnson, R. P., and Desrosiers, R. C. (1998). Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Curr Opin Immunol* **10**(4), 436-43.
- Johnson, R. P., Lifson, J. D., Czajak, S. C., Cole, K. S., Manson, K. H., Glickman, R., Yang, J., Montefiori, D. C., Montelaro, R., Wyand, M. S., and Desrosiers, R. C. (1999). Highly attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus protect against vaginal challenge: inverse relationship of degree of protection with level of attenuation. *J Virol* **73**(6), 4952-61.
- Karwowska, S., Gorny, M. K., Buchbinder, A., Gianakakos, V., Williams, C., Fuerst, T., and Zolla-Pazner, S. (1992). Production of human monoclonal antibodies specific for conformational and linear non-V3 epitopes of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**(6), 1099-106.

- Kaul, R., Plummer, F. A., Kimani, J., Dong, T., Kiama, P., Rostron, T., Njagi, E., MacDonald, K. S., Bwayo, J. J., McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. L. (2000). HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol* **164**(3), 1602-11.
- Keppler, O. T., Yonemoto, W., Welte, F. J., Patton, K. S., Iacovides, D., Atchison, R. E., Ngo, T., Hirschberg, D. L., Speck, R. F., and Goldsmith, M. A. (2001). Susceptibility of rat-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **75**(17), 8063-8073.
- Keppler, O. T., Welte, F. J., Ngo, T. A., Chin, P. S., Patton, K. S., Tsou, C. L., Abbey, N. W., Sharkey, M. E., Grant, R. M., You, Y., Scarborough, J. D., Ellmeier, W., Littman, D. R., Stevenson, M., Charo, I. F., Herndier, B. G., Speck, R. F., and Goldsmith, M. A. (2002). Progress toward a human CD4/CCR5 transgenic rat model for de novo infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* **195**(6), 719-36.
- Kliger, Y., and Shai, Y. (1997). A leucine zipper-like sequence from the cytoplasmic tail of the HIV-1 envelope glycoprotein binds and perturbs lipid bilayers. *Biochemistry* **36**(17), 5157-69.
- Klimkait, T., Strebel, K., Hoggan, M. D., Martin, M. A., and Orenstein, J. M. (1990). The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* **64**(2), 621-9.
- Koch, M., Pancera, M., Kwong, P. D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W. A., Sodroski, J., and Wyatt, R. (2003). Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**(2), 387-400.
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* **68**(7), 4650-5.
- Kräusslich, H. G., Ochsenbauer, C., Traenckner, A. M., Mergener, K., Facke, M., Gelderblom, H. R., and Bosch, V. (1993). Analysis of protein expression and virus-like particle formation in mammalian cell lines stably expressing HIV-1 gag and env gene products with or without active HIV proteinase. *Virology* **192**(2), 605-17.

- Krüger, U., Pfeiffer, T., and Bosch, V. (1996). Generation of lymphocyte cell lines coexpressing CD4 and wild-type or mutant HIV type 1 glycoproteins: implications for HIV type 1 Env- induced cell lysis. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**(9), 783-92.
- Kuhmann, S. E., Platt, E. J., Kozak, S. L., and Kabat, D. (2000). Cooperation of multiple CCR5 coreceptors is required for infections by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**(15), 7005-15.
- Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Charini, W. A., Nickerson, C. E., Lifton, M. A., Lord, C. I., Forman, M. A., and Letvin, N. L. (1999). Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J Immunol* **162**(9), 5127-33.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**(6686), 648-59.
- Lasky, L. A., Nakamura, G., Smith, D. H., Fennie, C., Shimasaki, C., Patzer, E., Berman, P., Gregory, T., and Capon, D. J. (1987). Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell* **50**(6), 975-85.
- Layne, S. P., Merges, M. J., Dembo, M., Spouge, J. L., Conley, S. R., Moore, J. P., Raina, J. L., Renz, H., Gelderblom, H. R., and Nara, P. L. (1992). Factors underlying spontaneous inactivation and susceptibility to neutralization of human immunodeficiency virus. *Virology* **189**(2), 695-714.
- Leonard, C. K., Spellman, M. W., Riddle, L., Harris, R. J., Thomas, J. N., and Gregory, T. J. (1990). Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **265**(18), 10373-82.
- Leung, L., Srivastava, I. K., Kan, E., Legg, H., Sun, Y., Greer, C., Montefiori, D. C., zur Megede, J., and Barnett, S. W. (2004). Immunogenicity of HIV-1 Env and Gag in baboons using a DNA prime/protein boost regimen. *Aids* **18**(7), 991-1001.
- Levy, J. A., Hoffman, A. D., Kramer, S. M., Landis, J. A., Shimabukuro, J. M., and Oshiro, L. S. (1984). Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* **225**(4664), 840-2.

- Li, Y., Kappes, J. C., Conway, J. A., Price, R. W., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1991). Molecular characterization of human immunodeficiency virus type 1 cloned directly from uncultured human brain tissue: identification of replication-competent and -defective viral genomes. *J Virol* **65**(8), 3973-85.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (1994). Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology* **204**(1), 266-78.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (2000). The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**(2), 417-28.
- Lifson, J. D., Piatak, M., Jr., Rossio, J. L., Bess, J., Jr., Chertova, E., Schneider, D., Kiser, R., Coalter, V., Poore, B., Imming, R., Desrosiers, R. C., Henderson, L. E., and Arthur, L. O. (2002). Whole inactivated SIV virion vaccines with functional envelope glycoproteins: safety, immunogenicity, and activity against intrarectal challenge. *J Med Primatol* **31**(4-5), 205-16.
- Lifson, J. D., Rossio, J. L., Piatak, M., Jr., Bess, J., Jr., Chertova, E., Schneider, D. K., Coalter, V. J., Poore, B., Kiser, R. F., Imming, R. J., Scarzello, A. J., Henderson, L. E., Alvord, W. G., Hirsch, V. M., Benveniste, R. E., and Arthur, L. O. (2004). Evaluation of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of whole inactivated simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* **20**(7), 772-87.
- Lindwasser, O. W., and Resh, M. D. (2001). Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains. *J Virol* **75**(17), 7913-24.
- Louder, M. K., Sambor, A., Chertova, E., Hunte, T., Barrett, S., Ojong, F., Sanders-Buell, E., Zolla-Pazner, S., McCutchan, F. E., Roser, J. D., Gabuzda, D., Lifson, J. D., and Mascola, J. R. (2005). HIV-1 envelope pseudotyped viral vectors and infectious molecular clones expressing the same envelope glycoprotein have a similar neutralization phenotype, but culture in peripheral blood mononuclear cells is associated with decreased neutralization sensitivity. *Virology* **339**(2), 226-38.

- Louie, K. A., Dadgari, J. M., DeBoer, B. M., Weisbuch, H., Snow, P. M., Cheevers, W. P., Douvas, A., and McMillan, M. (2003). Caprine arthritis-encephalitis virus-infected goats can generate human immunodeficiency virus-gp120 cross-reactive antibodies(1). *Virology* **315**(1), 217-23.
- Luban, J., and Goff, S. P. (1994). Mutational analysis of cis-acting packaging signals in human immunodeficiency virus type 1 RNA. *J Virol* **68**(6), 3784-93.
- Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J., and Cullen, B. R. (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**(4), 675-83.
- Mammano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A., and Gottlinger, H. G. (1995). Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoproteins with short cytoplasmic domains. *J Virol* **69**(6), 3824-30.
- Mariani, R., Rutter, G., Harris, M. E., Hope, T. J., Krausslich, H. G., and Landau, N. R. (2000). A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *J Virol* **74**(8), 3859-70.
- Mariani, R., Chen, D., Schrofelbauer, B., Navarro, F., Konig, R., Bollman, B., Munk, C., Nymark-McMahon, H., and Landau, N. R. (2003). Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* **114**(1), 21-31.
- Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L., and Kabat, D. (2003). HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* **9**(11), 1398-403.
- Mascola, J. R., Lewis, M. G., Stiegler, G., Harris, D., VanCott, T. C., Hayes, D., Louder, M. K., Brown, C. R., Sapan, C. V., Frankel, S. S., Lu, Y., Robb, M. L., Katinger, H., and Birx, D. L. (1999). Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol* **73**(5), 4009-18.
- Mascola, J. R., Stiegler, G., VanCott, T. C., Katinger, H., Carpenter, C. B., Hanson, C. E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S. S., Birx, D. L., and Lewis, M. G. (2000). Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat Med* **6**(2), 207-10.
- Massiah, M. A., Starich, M. R., Paschall, C., Summers, M. F., Christensen, A. M., and Sundquist, W. I. (1994). Three-dimensional structure of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein. *J Mol Biol* **244**(2), 198-223.

- Masur, H., Michelis, M. A., Greene, J. B., Onorato, I., Stouwe, R. A., Holzman, R. S., Wormser, G., Brettman, L., Lange, M., Murray, H. W., and Cunningham-Rundles, S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* **305**(24), 1431-8.
- McCallus, D. E., Ugen, K. E., Sato, A. I., Williams, W. V., and Weiner, D. B. (1992). Construction of a recombinant bacterial human CD4 expression system producing a bioactive CD4 molecule. *Viral Immunol* **5**(2), 163-72.
- McCune, J. M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L. D., Lieberman, M., and Weissman, I. L. (1988a). The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* **241**(4873), 1632-9.
- McCune, J. M., Rabin, L. B., Feinberg, M. B., Lieberman, M., Kosek, J. C., Reyes, G. R., and Weissman, I. L. (1988b). Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* **53**(1), 55-67.
- McNeil, A. C., Shupert, W. L., Iyasere, C. A., Hallahan, C. W., Mican, J. A., Davey, R. T., Jr., and Connors, M. (2001). High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24), 13878-83.
- McNeil, J. G., Johnston, M. I., Birx, D. L., and Tramont, E. C. (2004). Policy rebuttal. HIV vaccine trial justified. *Science* **303**(5660), 961.
- Mebatsion, T., Finke, S., Weiland, F., and Conzelmann, K. K. (1997). A CXCR4/CD4 pseudotype rhabdovirus that selectively infects HIV-1 envelope protein-expressing cells. *Cell* **90**(5), 841-7.
- Mehandru, S., Poles, M. A., Tenner-Racz, K., Horowitz, A., Hurley, A., Hogan, C., Boden, D., Racz, P., and Markowitz, M. (2004). Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* **200**(6), 761-70.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M., and Cohen, F. S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**(2), 413-23.
- Milich, L., Margolin, B., and Swanstrom, R. (1993). V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 Env protein: interpreting sequence variability. *J Virol* **67**(9), 5623-34.

- Mizukami, T., Fuerst, T. R., Berger, E. A., and Moss, B. (1988). Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23), 9273-7.
- Mizuochi, T., Matthews, T. J., Kato, M., Hamako, J., Titani, K., Solomon, J., and Feizi, T. (1990). Diversity of oligosaccharide structures on the envelope glycoprotein gp 120 of human immunodeficiency virus 1 from the lymphoblastoid cell line H9. Presence of complex-type oligosaccharides with bisecting N-acetylglucosamine residues. *J Biol Chem* **265**(15), 8519-24.
- Montefiori, D. C., Safrit, J. T., Lydy, S. L., Barry, A. P., Bilska, M., Vo, H. T., Klein, M., Tartaglia, J., Robinson, H. L., and Rovinski, B. (2001). Induction of neutralizing antibodies and gag-specific cellular immune responses to an R5 primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 in rhesus macaques. *J Virol* **75**(13), 5879-90.
- Montelaro, R. C., Robey, W. G., West, M. D., Issel, C. J., and Fischinger, P. J. (1988). Characterization of the serological cross-reactivity between glycoproteins of the human immunodeficiency virus and equine infectious anaemia virus. *J Gen Virol* **69** (Pt 7), 1711-7.
- Moog, C., Fleury, H. J., Pellegrin, I., Kirn, A., and Aubertin, A. M. (1997). Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**(5), 3734-41.
- Moore, J. P., and Klasse, P. J. (1992). Thermodynamic and kinetic analysis of sCD4 binding to HIV-1 virions and of gp120 dissociation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**(4), 443-50.
- Moore, J. P., Cao, Y., Qing, L., Sattentau, Q. J., Pyati, J., Koduri, R., Robinson, J., Barbas, C. F., 3rd, Burton, D. R., and Ho, D. D. (1995a). Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J Virol* **69**(1), 101-9.
- Moore, J. P., and Ho, D. D. (1995b). HIV-1 neutralization: the consequences of viral adaptation to growth on transformed T cells. *Aids* **9 Suppl A**, S117-36.
- Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M., and Wilson, D. B. (1988). Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**(6187), 256-9.

- Mosier, D. E. (1991). Adoptive transfer of human lymphoid cells to severely immunodeficient mice: models for normal human immune function, autoimmunity, lymphomagenesis, and AIDS. *Adv Immunol* **50**, 303-25.
- Murphey-Corb, M., Martin, L. N., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R. C., Miller, M., West, M., Ohkawa, S., Baskin, G. B., Zhang, J. Y., Putney, S. D., and et al. (1989). A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* **246**(4935), 1293-7.
- Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**(5259), 263-7.
- Nguyen, D. H., and Hildreth, J. E. (2000). Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* **74**(7), 3264-72.
- Notka, F., Stahl-Hennig, C., Dittmer, U., Wolf, H., and Wagner, R. (1999). Accelerated clearance of SHIV in rhesus monkeys by virus-like particle vaccines is dependent on induction of neutralizing antibodies. *Vaccine* **18**(3-4), 291-301.
- Ono, A., and Freed, E. O. (2001). Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24), 13925-30.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(18), 8392-6.
- Piatak, M., Jr., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Lifson, J. D. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science* **259**(5102), 1749-54.
- Pizzato, M., Marlow, S. A., Blair, E. D., and Takeuchi, Y. (1999). Initial binding of murine leukemia virus particles to cells does not require specific Env-receptor interaction. *J Virol* **73**(10), 8599-611.
- Platt, E. J., Wehrly, K., Kuhmann, S. E., Chesebro, B., and Kabat, D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**(4), 2855-64.

- Poiesz, B. J., Ruscetti, F. W., Gazdar, A. F., Bunn, P. A., Minna, J. D., and Gallo, R. C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12), 7415-9.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E., and Gallo, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**(4648), 497-500.
- Quinn, T. C., Wawer, M. J., Sewankambo, N., Serwadda, D., Li, C., Wabwire-Mangen, F., Meehan, M. O., Lutalo, T., and Gray, R. H. (2000). Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. *N Engl J Med* **342**(13), 921-9.
- Roben, P., Moore, J. P., Thali, M., Sodroski, J., Barbas, C. F., 3rd, and Burton, D. R. (1994). Recognition properties of a panel of human recombinant Fab fragments to the CD4 binding site of gp120 that show differing abilities to neutralize human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**(8), 4821-8.
- Robey, W. G., Arthur, L. O., Matthews, T. J., Langlois, A., Copeland, T. D., Lerche, N. W., Oroszlan, S., Bolognesi, D. P., Gilden, R. V., and Fischinger, P. J. (1986). Prospect for prevention of human immunodeficiency virus infection: purified 120-kDa envelope glycoprotein induces neutralizing antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(18), 7023-7.
- Rogel, M. E., Wu, L. I., and Emerman, M. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 vpr gene prevents cell proliferation during chronic infection. *J Virol* **69**(2), 882-8.
- Rous, P. (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* **13**, 397-411.
- Rousso, I., Mixon, M. B., Chen, B. K., and Kim, P. S. (2000). Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25), 13523-5.
- Rovinski, B., Haynes, J. R., Cao, S. X., James, O., Sia, C., Zolla-Pazner, S., Matthews, T. J., and Klein, M. H. (1992). Expression and characterization of genetically engineered human immunodeficiency virus-like particles containing modified envelope glycoproteins: implications for development of a cross-protective AIDS vaccine. *J Virol* **66**(7), 4003-12.

- Rowell, J. F., Stanhope, P. E., and Siliciano, R. F. (1995). Endocytosis of endogenously synthesized HIV-1 envelope protein. Mechanism and role in processing for association with class II MHC. *J Immunol* **155**(1), 473-88.
- Rowland-Jones, S., Sutton, J., Ariyoshi, K., Dong, T., Gotch, F., McAdam, S., Whitby, D., Sabally, S., Gallimore, A., Corrah, T., and et al. (1995). HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* **1**(1), 59-64.
- Saarloos, M. N., Sullivan, B. L., Czerniewski, M. A., Parameswar, K. D., and Spear, G. T. (1997). Detection of HLA-DR associated with monocytotropic, primary, and plasma isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **71**(2), 1640-3.
- Sanders, R. W., Venturi, M., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Katinger, H., Lloyd, K. O., Kwong, P. D., and Moore, J. P. (2002a). The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**(14), 7293-305.
- Sanders, R. W., Vesanen, M., Schuelke, N., Master, A., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Paluch, M., Berkhout, B., Maddon, P. J., Olson, W. C., Lu, M., and Moore, J. P. (2002b). Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **76**(17), 8875-89.
- Saphire, E. O., Parren, P. W., Pantophlet, R., Zwick, M. B., Morris, G. M., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Stanfield, R. L., Burton, D. R., and Wilson, I. A. (2001). Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* **293**(5532), 1155-9.
- Sawaya, B. E., Khalili, K., Mercer, W. E., Denisova, L., and Amini, S. (1998). Cooperative actions of HIV-1 Vpr and p53 modulate viral gene transcription. *J Biol Chem* **273**(32), 20052-7.
- Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and Burton, D. R. (2002). The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120. *J Virol* **76**(14), 7306-21.

- Scarlatti, G., Tresoldi, E., Bjorndal, A., Fredriksson, R., Colognesi, C., Deng, H. K., Malnati, M. S., Plebani, A., Siccardi, A. G., Littman, D. R., Fenyo, E. M., and Lusso, P. (1997). In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* **3**(11), 1259-65.
- Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Santra, S., Sasseville, V. G., Simon, M. A., Lifton, M. A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B. J., Ghayeb, J., Forman, M. A., Montefiori, D. C., Rieber, E. P., Letvin, N. L., and Reimann, K. A. (1999). Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**(5403), 857-60.
- Schnell, M. J., Johnson, J. E., Buonocore, L., and Rose, J. K. (1997). Construction of a novel virus that targets HIV-1-infected cells and controls HIV-1 infection. *Cell* **90**(5), 849-57.
- Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J. M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* **2**(3), 338-42.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., and Malim, M. H. (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* **418**(6898), 646-50.
- Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., Willey, R., Cho, M. W., and Martin, M. A. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med* **5**(2), 204-10.
- Shulman, M., Wilde, C. D., and Kohler, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* **276**(5685), 269-70.
- Signoret, N., Oldridge, J., Pelchen-Matthews, A., Klasse, P. J., Tran, T., Brass, L. F., Rosenkilde, M. M., Schwartz, T. W., Holmes, W., Dallas, W., Luther, M. A., Wells, T. N., Hoxie, J. A., and Marsh, M. (1997). Phorbol esters and SDF-1 induce rapid endocytosis and down modulation of the chemokine receptor CXCR4. *J Cell Biol* **139**(3), 651-64.
- Somia, N. V., Miyoshi, H., Schmitt, M. J., and Verma, I. M. (2000). Retroviral vector targeting to human immunodeficiency virus type 1-infected cells by receptor pseudotyping. *J Virol* **74**(9), 4420-4.

- Soneoka, Y., Cannon, P. M., Ramsdale, E. E., Griffiths, J. C., Romano, G., Kingsman, S. M., and Kingsman, A. J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**(4), 628-33.
- Sparacio, S., Zeilfelder, U., Pfeiffer, T., Henzler, T., and Bosch, V. (2000). Membrane fusion between retroviral particles: host-range extension and vaccine prospects. *Virology* **271**(2), 248-52.
- Sparacio, S., Pfeiffer, T., Holtkotte, D., and Bosch, V. (2002). Inter-retroviral fusion mediated by human immunodeficiency virus or murine leukemia virus glycoproteins: independence of cellular membranes and membrane vesicles. *Virology* **294**(2), 305-11.
- Srinivas, S. K., Srinivas, R. V., Anantharamaiah, G. M., Segrest, J. P., and Compans, R. W. (1992). Membrane interactions of synthetic peptides corresponding to amphipathic helical segments of the human immunodeficiency virus type-1 envelope glycoprotein. *J Biol Chem* **267**(10), 7121-7.
- Srivastava, I. K., Stamatatos, L., Kan, E., Vajdy, M., Lian, Y., Hilt, S., Martin, L., Vita, C., Zhu, P., Roux, K. H., Vojtech, L., D, C. M., Donnelly, J., Ulmer, J. B., and Barnett, S. W. (2003). Purification, characterization, and immunogenicity of a soluble trimeric envelope protein containing a partial deletion of the V2 loop derived from SF162, an R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol* **77**(20), 11244-59.
- Starcich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., Gallo, R. C., and et al. (1986). Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**(5), 637-48.
- Stegmann, T., Delfino, J. M., Richards, F. M., and Helenius, A. (1991). The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion. *J Biol Chem* **266**(27), 18404-10.
- Stott, E. J. (1991). Anti-cell antibody in macaques. *Nature* **353**(6343), 393.
- Sullivan, N., Sun, Y., Sattentau, Q., Thali, M., Wu, D., Denisova, G., Gershoni, J., Robinson, J., Moore, J., and Sodroski, J. (1998). CD4-Induced conformational changes in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein: consequences for virus entry and neutralization. *J Virol* **72**(6), 4694-703.

- Tesoro-Cruz, E., Hernandez-Gonzalez, R., Kretschmer-Schmid, R., and Aguilar-Setien, A. (2003). Cross-reactivity between caprine arthritis-encephalitis virus and type 1 human immunodeficiency virus. *Arch Med Res* **34**(5), 362-6.
- Tjotta, E., Hungnes, O., and Grinde, B. (1991). Survival of HIV-1 activity after disinfection, temperature and pH changes, or drying. *J Med Virol* **35**(4), 223-7.
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., and Moore, J. P. (1996a). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* **384**(6605), 184-7.
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J. P., and Katinger, H. (1996b). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**(2), 1100-8.
- Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., Oxenius, A., Weber, R., Stiegler, G., Vcelar, B., Katinger, H., Aceto, L., and Gunthard, H. F. (2005). Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* **11**(6), 615-22.
- Tsurudome, M., Gluck, R., Graf, R., Falchetto, R., Schaller, U., and Brunner, J. (1992). Lipid interactions of the hemagglutinin HA2 NH2-terminal segment during influenza virus-induced membrane fusion. *J Biol Chem* **267**(28), 20225-32.
- von Brunn, A., Brand, M., Reichhuber, C., Morys-Wortmann, C., Deinhardt, F., and Schodel, F. (1993). Principal neutralizing domain of HIV-1 is highly immunogenic when expressed on the surface of hepatitis B core particles. *Vaccine* **11**(8), 817-24.
- Wagner, R., Fliessbach, H., Wanner, G., Motz, M., Niedrig, M., Deby, G., von Brunn, A., and Wolf, H. (1992). Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol* **127**(1-4), 117-37.
- Wagner, R., Teeuwssen, V. J., Deml, L., Notka, F., Haaksma, A. G., Jhagjhoorsingh, S. S., Niphuis, H., Wolf, H., and Heeney, J. L. (1998). Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology* **245**(1), 65-74.

- Waterfield, M. D., Mayes, E. L., Stroobant, P., Bennet, P. L., Young, S., Goodfellow, P. N., Banting, G. S., and Ozanne, B. (1982). A monoclonal antibody to the human epidermal growth factor receptor. *J Cell Biochem* **20**(2), 149-61.
- Wei, B. L., Arora, V. K., Foster, J. L., Sodora, D. L., and Garcia, J. V. (2003). In vivo analysis of Nef function. *Curr HIV Res* **1**(1), 41-50.
- Wei, P., Garber, M. E., Fang, S. M., Fischer, W. H., and Jones, K. A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* **92**(4), 451-62.
- Weiss, C. D., Barnett, S. W., Cacalano, N., Killeen, N., Littman, D. R., and White, J. M. (1996). Studies of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion using a simple fluorescence assay. *Aids* **10**(3), 241-6.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**(6631), 426-30.
- Weng, Y., and Weiss, C. D. (1998). Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein gp41. *J Virol* **72**(12), 9676-82.
- Wilcox, C., Hu, J. S., and Olson, E. N. (1987). Acylation of proteins with myristic acid occurs cotranslationally. *Science* **238**(4831), 1275-8.
- Wilk, T., Pfeiffer, T., and Bosch, V. (1992). Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology* **189**(1), 167-77.
- Wilk, T., Pfeiffer, T., Bukovsky, A., Moldenhauer, G., and Bosch, V. (1996). Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain. *Virology* **218**(1), 269-74.
- Willey, R. L., Bonifacino, J. S., Potts, B. J., Martin, M. A., and Klausner, R. D. (1988). Biosynthesis, cleavage, and degradation of the human immunodeficiency virus 1 envelope glycoprotein gp160. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(24), 9580-4.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992a). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol* **66**(12), 7193-200.

- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992b). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* **66**(1), 226-34.
- Willey, R. L., Martin, M. A., and Peden, K. W. (1994). Increase in soluble CD4 binding to and CD4-induced dissociation of gp120 from virions correlates with infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**(2), 1029-39.
- Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**(5371), 1884-8.
- Xiao, X., Phogat, S., Shu, Y., Phogat, A., Chow, Y. H., Wei, O. L., Goldstein, H., Broder, C. C., and Dimitrov, D. S. (2003). Purified complexes of HIV-1 envelope glycoproteins with CD4 and CCR5(CXCR4): production, characterization and immunogenicity. *Vaccine* **21**(27-30), 4275-84.
- Yang, X., Wyatt, R., and Sodroski, J. (2001). Improved elicitation of neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency viruses by soluble stabilized envelope glycoprotein trimers. *J Virol* **75**(3), 1165-71.
- Yasutomi, Y., Reimann, K. A., Lord, C. I., Miller, M. D., and Letvin, N. L. (1993). Simian immunodeficiency virus-specific CD8⁺ lymphocyte response in acutely infected rhesus monkeys. *J Virol* **67**(3), 1707-11.
- York, J., Follis, K. E., Trahey, M., Nyambi, P. N., Zolla-Pazner, S., and Nunberg, J. H. (2001). Antibody binding and neutralization of primary and T-cell line-adapted isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **75**(6), 2741-52.
- Yu, X., Yu, Q. C., Lee, T. H., and Essex, M. (1992). The C terminus of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein is involved in early steps of the virus life cycle. *J Virol* **66**(9), 5667-70.
- Zhang, H., Yang, B., Pomerantz, R. J., Zhang, C., Arunachalam, S. C., and Gao, L. (2003). The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature* **424**(6944), 94-8.
- Zhou, J., and Aiken, C. (2001). Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity resulting from interviral fusion: evidence supporting a role for Nef at the virion envelope. *J Virol* **75**(13), 5851-9.

- Zhu, P., Chertova, E., Bess, J., Jr., Lifson, J. D., Arthur, L. O., Liu, J., Taylor, K. A., and Roux, K. H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26), 15812-7.
- Zhu, T., Korber, B. T., Nahmias, A. J., Hooper, E., Sharp, P. M., and Ho, D. D. (1998). An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**(6667), 594-7.

